

Reversible Cyclisierung von Peptiden –  
neue Synthesewege für Peptidantibiotika

---

Reversible Cyclization of Peptides –  
Novel Synthesis Routes for Peptide Antibiotics

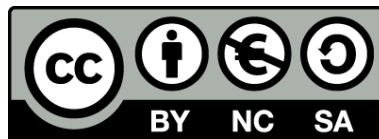
Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von

**Matthias Lamping**  
aus Dillenburg

Marburg an der Lahn 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>



Am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität  
als Dissertation eingereicht am: 06.04.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2016  
Hochschulkennziffer: 1180

---

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2012 bis August 2015 am Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg.

Mein besonderer Dank gilt

**Prof. Dr. Armin Geyer**

für die sehr große wissenschaftliche Freiheit, die hervorragende Unterstützung und Betreuung bei der Bearbeitung dieser vielseitigen sowie spannenden Thematik. Außerdem danke ich ihm, dass er mich erfolgreich zum Laufen gebracht hat.

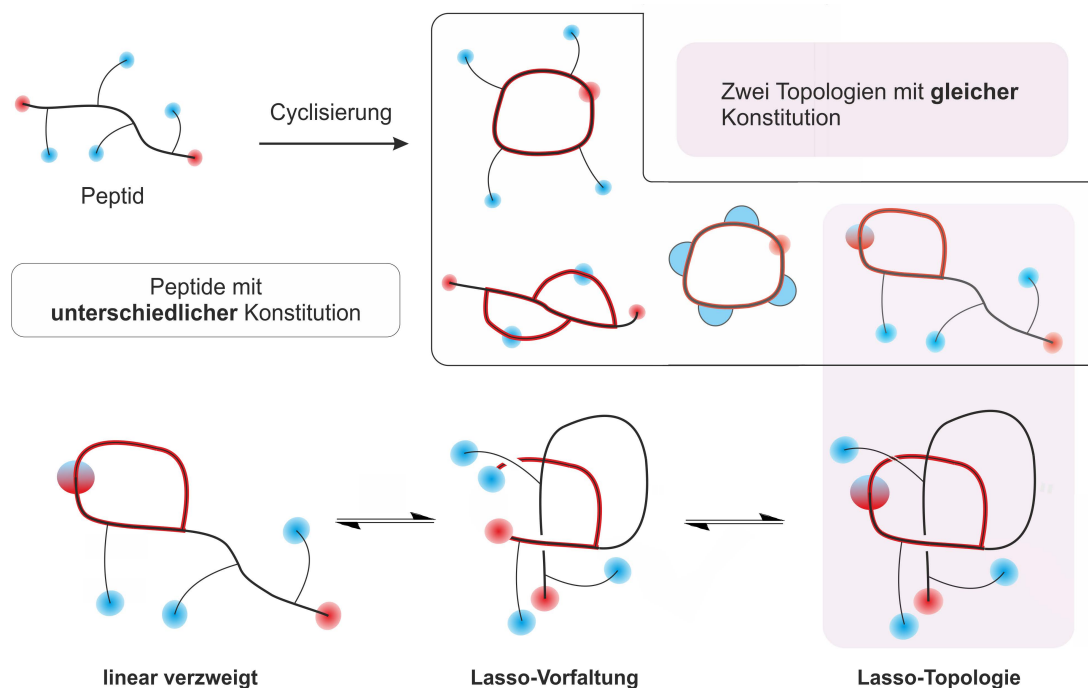
---

*Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.  
Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,  
es doch noch einmal zu versuchen.*

Thomas Alva Edison

## Abstract

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der reversiblen Synthese von cyclischen Peptiden mittels Substitution einer Amid-Bindung durch eine isostere Imin- bzw. Iminium-Bindung. Die reversible Cyclisierung sollte topologisch anspruchsvolle, macrocyclische Strukturen wie Lasso peptide synthetisch zugänglich machen und die Bildung dieser Macrocyklen im Gleichgewicht untersucht werden. Es wurden Methoden für die Synthese von C-terminalen, N-terminalen sowie Seitenketten-Peptidaldehyden vorgestellt, und deren Tendenz zur Cyclisierung NMR-spektroskopisch am Beispiel des Lasso peptides Microcin J25 untersucht. Microcin J25 besteht aus einem N-terminalen acht Aminosäuren großen Macrocyclus, durch den das C-terminale Ende durchgefädelt und durch nicht-kovalente Wechselwirkungen fixiert ist. Um die Methode zu etablieren, wurden verschiedene Peptide als C-terminale Peptidaldehyde synthetisiert und deren Cyclisierung in Phosphat-Puffer NMR-spektroskopisch analysiert. Untersucht wurde neben der Imin-Bildung die reversible Cyclisierung des Macrocyclus mittels Disulfidbrücken zum Erhalt eines korrekt eingefädelten synthetischen Lasso peptides. Die erhaltenen bicyclischen Disulfid-Derivate des Microcins J25 wurden auf ihre biologische Aktivität untersucht.



**Abbildung 0.1** Durch Substitution einer Amid-Bindung gegen eine isostere Imin-Bindung wird die Bildung von macrocyclischen Peptiden reversibel. Im Rahmen einer unselektiven Macrocyklisierung werden Peptide mit unterschiedlicher Konstitution erhalten. Neben diesen Konstitutionsisomeren können Peptide gebildet werden, welche die gleiche Konstitution, aber nicht die gleiche räumliche Anordnung, aufweisen (Topoisomere). Dargestellt sind hier eine linear verzweigte Topologie und die Lasso-Topologie. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden für die Synthese von topologischen Isomeren entwickelt und die gebildeten Peptide auf ihre Topologie analysiert. Basierend auf einer Lasso-Vorfaltung sollte in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen den abgebildeten Strukturen eingestellt und NMR-spektroskopisch analysiert werden.

*Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind in Vorbereitung:*

**Matthias Lamping**, Sebastian Enck und Armin Geyer. *Inverse  $\gamma$ -turn-Inspired Peptide: Synthesis and Analysis of Segetalin A Indole Hemiaminal.*

*Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7443–7448. DOI: 10.1002/ejoc.201501179

**Titelbild:** *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7339–7405. DOI: 10.1002/ejoc.201590099

**Matthias Lamping**, Yvonne Grell und Armin Geyer. *Synthesis and Conformational Analysis of an Expanded Cyclic Ketoxime-Hexapeptide.*

*J. Pept. Sci.* **2016**, 22, 228-235. DOI: 10.1002/psc.2873

Sabrina Fischer, **Matthias Lamping**, Maike Gold, Yvonne Röttger, Dörte Brödje, Richard Dodel, Renate Frantz, Mobarak A. Mraheil, Trinad Chakraborty und Armin Geyer. *Synthesis of a Biological Active  $\beta$ -hairpin Peptide by Addition of two Structural Motifs.*

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, Manuskript in Vorbereitung.

**Matthias Lamping**, Julian D. Hegemann, Mobarak A. Mraheil, Trinad Chakraborty, Mohamed A. Marahiel und Armin Geyer. *Reversibly Cyclized: Derivatives of the Lasso Peptide Microcin J25 show Antibiotic Activity.*

*ChemBioChem* **2016**, Manuskript in Vorbereitung.

*Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:*

**Poster:** „Macrocyclization of Peptide Aldehydes“

München, 11<sup>th</sup> German Peptide Symposium; 18.-21. März **2013**.

**Poster:** „Reversible Macrocyclization of Peptides“

Jena, 16<sup>th</sup> JCF-Frühjahrssymposium der GDCh; 26.-29. März **2014**.

**Poster:** „Ring-Chain Equilibria of Peptide Drug Aldehydes“

Istanbul, 5<sup>th</sup> EUCHEMS Chemistry Congress; 31. August – 4. September **2014**.

**Postervortrag:** „Reversible Cyclization for the Synthesis of Knotted Peptides“

Münster, 17<sup>th</sup> JCF-Frühjahrssymposium der GDCh; 25.-28. März **2015**.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract.....</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Chemische Topologie.....	1
1.1.1 Von mathematischer Topologie bis zu synthetischen Kleeblattknoten .....	1
1.1.2 Nomenklatur von topologischen Isomeren .....	4
1.1.3 Synthesemethoden von topologisch anspruchsvollen Strukturen .....	6
1.1.4 Strukturaufklärung und Differenzierung von Topologien.....	9
1.2 Organische und peptidische Naturstoffe .....	12
1.2.1 Antibiotische und antimikrobielle Peptide.....	14
1.2.2 Ribosomale (RPS) und nichtribosomale Peptidsynthese (NRPS).....	15
1.2.3 Ribosomal synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide.....	19
1.3 Lasso peptide .....	21
1.3.1 Struktur, Aufbau und Stabilität.....	24
1.3.2 Biosynthese .....	27
1.3.3 Biologische Aktivität.....	29
<b>2 Aufgabenstellung.....</b>	<b>32</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>35</b>
3.1 Synthese und Cyclisierung von C-terminalen Peptidaldehyden .....	35
3.1.1 Synthesestrategie von C-terminalen Peptidaldehyden.....	35
3.1.2 Festphasensynthese von C-terminalen Peptidaldehyden.....	37
3.1.3 Synthese und Cyclisierung des Segetalin A Aldehyds.....	39
3.1.4 Oxidation des Segetalin A Halbaminals.....	46
3.1.5 Cyclisierung eines Hexapeptids mittels reduktiver Aminierung .....	47
3.1.6 Cyclisierung eines Enaminpeptids .....	50
3.2 Studien zur Totalsynthese von Psychrophilin E .....	53
3.2.1 Reversibler Syntheseansatz von Psychrophilin E .....	54
3.2.2 Irreversibler Syntheseansatz von Psychrophilin E .....	57

3.3	Synthese von cyclischen Aldoxim-Peptiden .....	60
3.4	Synthesestrategie von cyclischen Ketoxim-Peptiden .....	63
3.4.1	Synthese und Cyclisierung eines C-terminalen Hydroxylamin-Peptidketons..	63
3.5	Synthesestrategie von N-terminalen Peptidaldehyden .....	68
3.5.1	Synthese von N-terminalen Peptidaldehyden .....	68
3.5.2	Cyclisierung von N-terminalen Peptidaldehyden .....	70
3.6	Synthese und Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden .....	72
3.6.1	Synthesestrategie von Seitenketten-Peptidaldehyden .....	72
3.6.2	Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Olefine .....	74
3.6.3	Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Olefine .....	78
3.6.4	Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Diole .....	81
3.6.5	Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über ein Dipeptid .....	82
3.6.6	Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden über ein Dipeptid.....	87
3.7	Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Aldehyden .....	91
3.7.1	Alternative Cyclisierung von Microcin J25 Aldehyden.....	94
3.8	Optimierung der Löslichkeit von Microcin J25 Peptiden .....	95
3.9	Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Disulfiden .....	97
3.10	Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Tetrasulfiden .....	101
3.10.1	Synthesestrategien von zweifach disulfidverbrückten Peptiden .....	101
3.10.2	Unterschiede zwischen Di- und Tetrasulfiden .....	103
3.11	NMR-Strukturanalyse der Microcin J25 Tetrasulfide.....	105
3.11.1	Zuordnung der Signale des <sup>1</sup> H-NMR-Spektrums für die Strukturaufklärung.	105
3.11.2	Charakterisierung von intramolekularen Wasserstoffbrücken .....	107
3.11.3	Aufklärung der Struktur der Tetrasulfide mittels NOE-Kontakten.....	108
3.11.4	Inverse Cyclisierung eines Microcin J25 Tetrasulfids.....	110
3.12	CD-Spektroskopie von Microcin J25 und dessen Derivaten .....	112
3.13	Chemische und thermische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide .....	115
3.13.1	Proteolytische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide.....	115

3.13.2	Thermische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide.....	116
3.14	Bestimmung der biologischen Aktivität von synthetischen Peptiden.....	118
3.14.1	Bestimmung der biologischen Aktivität von synthetischen Microcinen .....	118
3.14.2	Bestimmung der biologischen Aktivität eines Filaggrin-Derivates .....	122
3.15	Studien zur Totalsynthese von Lassomycin.....	124
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>130</b>
<b>5</b>	<b>Summary and Outlook.....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>136</b>
6.1	Allgemeine Anmerkungen .....	136
6.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Festphasenpeptidsynthese .....	138
6.3	Synthese der Aminosäure-Bausteine .....	144
6.4	Festphasensynthese der Peptide .....	181
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>248</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>264</b>



## Abkürzungen

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
A	Adenin
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
C	Cytosin
CD	<i>circular dichroism</i> (Circulardichroismus)
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> (zellpenetrierendes Peptid)
2-CTC	2-Chlorotritylchlorid
d	<i>day</i> / Dublett (NMR) / Durchmesser
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Doppeldublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEE	Diethylether
DFB	Deutscher Fussball-Bund
DIC	<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVB	Divinylbenzol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eq	Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	<i>et alii, et aliae</i> (und andere)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanin

## Abkürzungen

---

gef.	gefunden
HBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i> (Heterokern-Mehrbindungs-Korrelations-Spektroskopie)
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hot=Tap	Hydroxythreonin=Thiaprolin (Dipeptidmimetikum)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungschromatographie)
HRMS	<i>high resolution mass spectroscopy</i> (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i> (Heterokern-Einquanten-Korrelations-Spektroskopie)
IBCF	Isobutylchlorformiat
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
M	Molarität
m	Multiplett (NMR)
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i> (Kern-Overhauser-Effekt)
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i> (Kern-Overhauser-Effekt-verstärkende Spektroskopie)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PDB	Proteindatenbank ( <a href="http://www.rcsb.org">www.rcsb.org</a> )
ppb	<i>parts per billion</i> (Temperaturgradienten)
ppm	<i>parts per million</i> (NMR, Teile von einer Million)
q	Quartett (NMR)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (DC)
ROE	<i>rotating frame nuclear overhauser effect</i> (im rotierenden Koordinatensystem auftretender Kern-Overhauser-Effekt)
ROESY	<i>rotating frame nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i> (Kern-Overhauser-Effekt verstärkende Spektroskopie im rotierenden Koordinatensystem)

## Abkürzungen

---

RT	Raumtemperatur (~20 °C)
s	Singulett (NMR) / Sekunde
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
Su	Succinimid
t	Triplett (NMR)
T	Thymin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Tri <i>is</i> opropylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i> (totale Korrelations-Spektroskopie)
Trt	Triphenylmethyl
TSP	Natrium-(Trimethylsilyl)-propionat <sub>d4</sub>
U	Uracil
WATERGATE	<i>WATER suppression by GrAdient Tailoired Excitation</i> (NMR-Pulssequenz für biologische Proben in wässrigem Lösungsmittel)
Xaa	beliebige Aminosäure (proteinogen und nicht-proteinogen)

## *Abkürzungen*

---

Übersicht der proteinogenen sowie in dieser Arbeit zusätzlich synthetisierten Aminosäuren. Für die proteinogenen Aminosäuren sind die Ein- und Drei-Buchstabencodes angegeben, für synthetische Derivate wurden passende Drei-Buchstabencodes ausgewählt. In Klammern sind die Seitenketten-Schutzgruppen für die Festphasenpeptidsynthese angegeben.

Ala	A	Alanin
Ahx		6-Aminohexansäure
Arg (Pbf)	R	Arginin
Asa		Asparaginsäure-Aldehyd
Asn (Trt)	N	Asparagin
Asp ( <i>t</i> Bu)	D	Asparaginsäure
Cit		Citrullin
Cys (Trt)	C	Cystein
Gda	X	Glycinal-Dimethylacetal
Gla		Glycinaldehyd
Gld		Glycindiol
Gln (Trt)	Q	Glutamin
Glu ( <i>t</i> Bu)	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
Goly		2-(Aminooxy)essigsäure
Hag		Homoallylglycin
His (Trt)	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Kly		Glycinon
Leu	L	Leucin
Lys (Boc)	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser ( <i>t</i> Bu)	S	Serin
Thr ( <i>t</i> Bu)	T	Threonin
Trp (Boc)	W	Tryptophan
Tyr ( <i>t</i> Bu)	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

# 1 Einleitung

## 1.1 Chemische Topologie

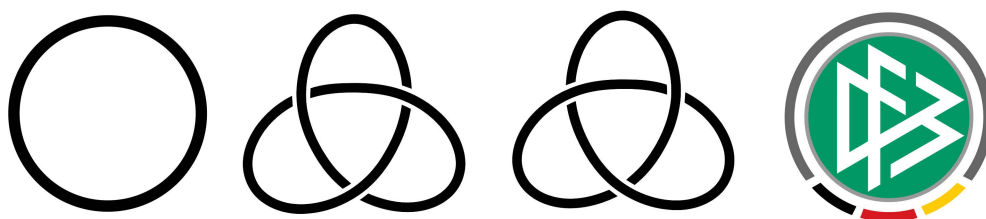
### 1.1.1 Von mathematischer Topologie bis zu synthetischen Kleeblattknoten

Die Topologie, als Lehre von räumlichen Beziehungen und Teilgebiet der Mathematik, wurde bereits 1736 vom Schweizer Mathematiker LEONHARD EULER in dem Aufsatz „*Lösung eines Problems, das der Geometrie der Lage angehört.*“ im Rahmen des Königsberger (Kaliningrad) Brückenproblems, der den Grundstein der modernen Graphentheorie legte, beschrieben.<sup>[1–3]</sup> Das Wort Topologie leitet sich aus den griechischen Worten *topos* (Raum, Ort) und *logos* (Lehre) ab. Strukturen, die sich in ihrer Konstitution nicht unterscheiden, aber eine unterschiedliche räumliche Anordnung aufweisen, werden als topologische Isomere oder Topoisomere bezeichnet. Als einfaches, makroskopisches Beispiel kann die Anordnung von Ringen betrachtet werden, welche die Chemie als Catenane bezeichnet (Abb. 1.1).<sup>[4]</sup>



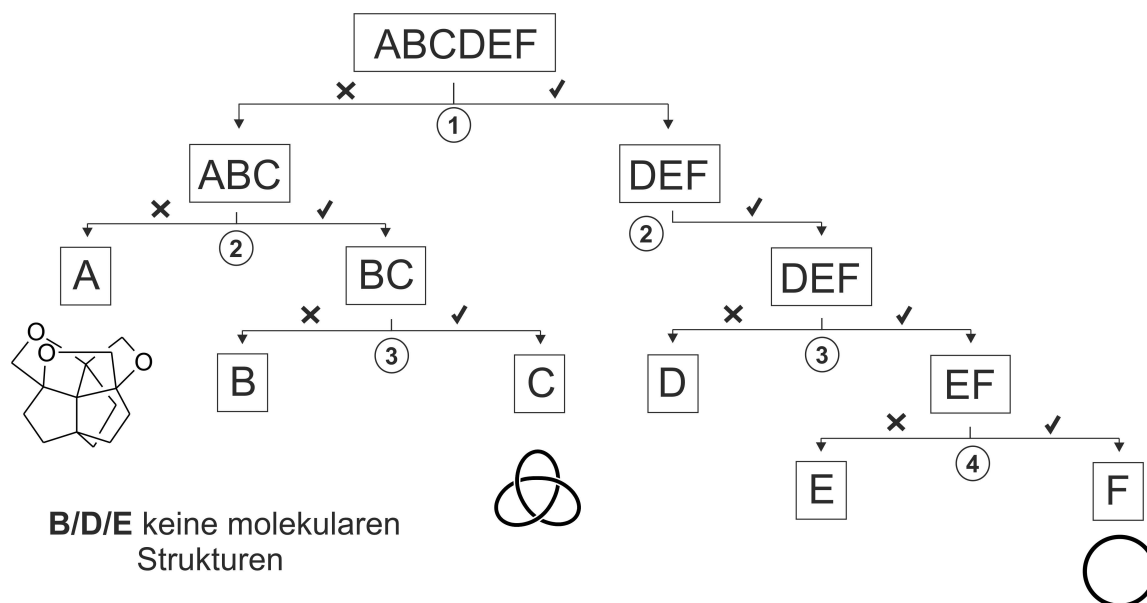
**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung von topologischen Isomeren am Beispiel der Borromäischen Ringe. Beide Strukturen bestehen aus dem gleichen Ringsystem, weisen aber eine gänzlich unterschiedliche räumliche Anordnung auf.

Die Synthese von Catenanen wurde 1983 von SAUVAGE in zwei Strategien unterteilt und basiert auf einem Templat-Effekt, der durch ein Übergangsmetall induziert wird.<sup>[5]</sup> Neben den ausgiebig untersuchten Catenanen stellen verknotete Strukturen eine weitere große Klasse von Topoisomeren dar, die aus einfachen Ringverbindungen bestehen, welche nicht ohne Bindungsbruch entknotet werden können. Als prominentes Beispiel der Knotane zählt der Kleeblattknoten, der eine zentrale Rolle in der Knotentheorie einnimmt und oft in alltäglichen Bildern und Symbolen wie dem Logo des DFBs zu erkennen ist (Abb. 1.2).<sup>[6]</sup>



**Abbildung 1.2** In der Mitte dargestellt sind die beiden Topoisomere, die durch die Verknotung des linken Ringes zum Kleeblattknoten entstehen. Die Topoisomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild und werden daher als topologisch chiral bezeichnet. Rechts gezeigt ist das DFB-Logo, das in abstrakter Form einen Kleeblattknoten darstellt.<sup>[6]</sup>

Bei der Klassifizierung von molekularen Graphen wird zunächst zwischen der klassischen und der topologischen Chiralität unterschieden. Die stereochemische Chiralität, die in Form von niedermolekularen Verbindungen wie Aminosäuren und Zuckern bekannt ist, enthält die klassischen Einheiten Punkte, Achse, Helix und Ebene. Topologische Chiralität hingegen wird über nicht-planare molekulare Graphen beschrieben, wie sie im mittleren Teil der Abbildung 1.2 dargestellt sind.<sup>[7]</sup> Theoretisch gesehen können solche topologische Strukturen und deren Graphen in die sechs Klassen A-F eingeteilt werden. Im folgenden Flussdiagramm werden die unterschiedlichen Klassen aufgeführt und die Einteilung durch Entscheidungsfragen erläutert (Abb. 1.3). Als erste Einteilung (1) erfolgt die Unterscheidung zwischen topologisch chiral (x) oder achiral (✓), in der zweiten Ebene wird überprüft, ob die Graphen mindestens eine topologisch achirale Einbettung aufweisen (2). Um die topologisch chiralen/achiralen Graphen weiter zu klassifizieren, wird untersucht, ob die Struktur mindestens eine Einbettung aufweist, die zu einer achiralen Punktgruppe zählt (3). In der letzten Frage wird überprüft, ob eine starre achirale Darstellung vorliegt oder nicht (4). Es ergeben sich  $2^4 = 16$  mögliche Kombinationen, von denen zehn nicht realisierbar sind, da sie logische Widersprüche darstellen.<sup>[7-9]</sup>

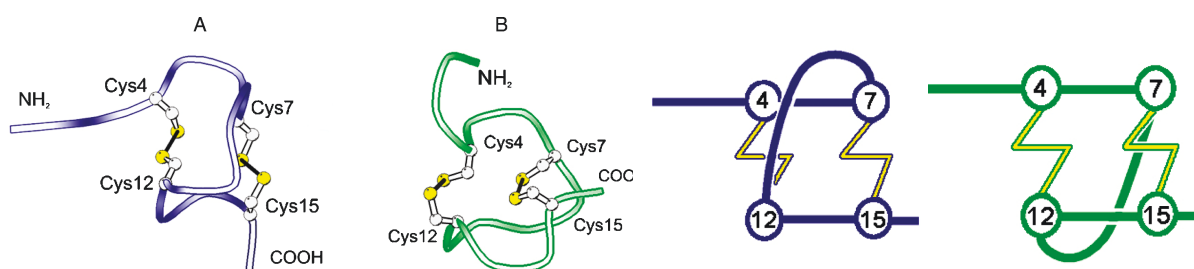


**Abbildung 1.3** Flussdiagramm zur Klassifikation von Graphen in die sechs Klassen A-F. Zur Einteilung sind die vier Entscheidungsfragen 1-4 nötig. Die Klassen A, C und F werden durch eine Vielfalt an chemischen Strukturen repräsentiert, für die restlichen Klassen B, D und E existieren noch keine molekularen Verbindungen.<sup>[7]</sup>

Für die Klassen A, C und F existieren chemische Strukturen, die durch gerichtete Synthesen dargestellt werden können. Für die verbleibenden Klassen existieren jedoch keine molekularen Verbindungen.<sup>[7-9]</sup> Im Folgenden und im Rahmen dieser Arbeit werden Lasso peptide als Vertreter der Klasse C näher betrachtet und analysiert.

In der Natur erfolgt auf molekularer Ebene die Generierung von topologisch anspruchsvollen und außergewöhnlichen Strukturen über chemo- sowie regioselektive Umsetzungen, die meist durch Enzyme oder durch eine bestimmte Umgebung realisiert werden. Im Rahmen der Knotane konnte gezeigt werden, dass deren nanometergroßen Strukturen für die topologische Chiralität essentiell ist.<sup>[10,11]</sup> FRISCH und WASSERMANN zeigten 1961 durch Berechnungen, dass bereits für die einfache Struktur eines Kleeblattknotens eine Kohlenwasserstoffkette mit mindestens 50 Methylengruppen nötig ist, um ein nanoskaliges Makromolekül in dieser Topologie zu realisieren.<sup>[10]</sup>

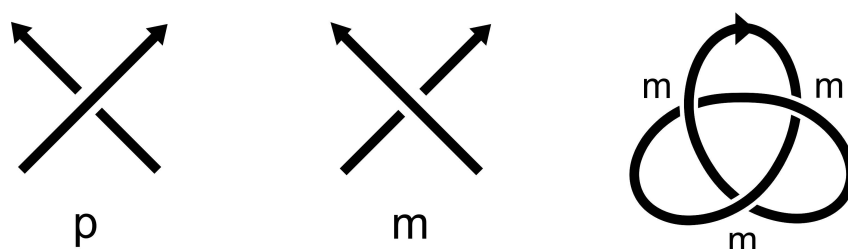
Topoisomere sind in der Natur vor allem im Bereich der DNA bekannt, wenn durch die Topoisomerasen I oder II sogenannte *supercoiled* DNA entspannt wird.<sup>[12–17]</sup> Weitere Beispiele von natürlichen und verknoteten Strukturen sind Lactoferrin, Ascorbinsäureoxidase sowie eine Reihe von peptidischen Strukturen wie Circulin A und B, Amatoxine, Conotoxine, Contryphane und Cyclotide.<sup>[11,18,19]</sup> In vielen der genannten Beispielen erfolgt die Biosynthese solcher Topologien über chemo- und/oder regioselektive Reaktionen, die im Labor eine besondere Herausforderung darstellen. Die besondere räumliche Struktur dieser Naturstoffe führt meist zu hohen biologischen Aktivitäten, die ähnlich der chiralen Stereozentren oft nur in einer bestimmten Konfiguration die gewünschte Wirkung zeigen (Thalidomid).<sup>[20]</sup> Bei menschlichem Uroguanylin, das vier Cysteine enthält und insgesamt aus 15 Aminosäuren besteht, kann dieses Phänomen beobachtet werden.<sup>[21,22]</sup> Je nach Bildung der Disulfidbrücken im nativen Muster Cys<sup>4</sup>/Cys<sup>12</sup> und Cys<sup>7</sup>/Cys<sup>15</sup> treten zwei topologische Isomere A und B auf, von denen nur Isomer A eine biologische Aktivität zeigt (siehe Abb. 1.4).<sup>[23]</sup> Andere mögliche Disulfid-Verknüpfungsmuster weisen keine topologischen Isomere auf.



**Abbildung 1.4** 3D-Strukturmodelle der topologischen Isomere des humanen Uroguanylin A (blau) und B (grün). Links sind energieminierte Darstellungen der Strukturen, rechts schematische Zeichnungen der Topologien gezeigt. Die Isomere können in einem sterisch kontrollierten Prozess ohne Umlagerung der Disulfide ineinander umgewandelt werden. Dies geschieht durch Variation der Temperatur und kann durch die Modifizierung des C-terminalen Endes gesteuert werden. Die Abbildung wurde leicht modifiziert entnommen aus: K. Adermann, K. Barlos, *Oxidative Folding of Peptides and Proteins*, RSC Biomolecular Sciences, Cambridge, **2009**, p. 305.<sup>[23]</sup>

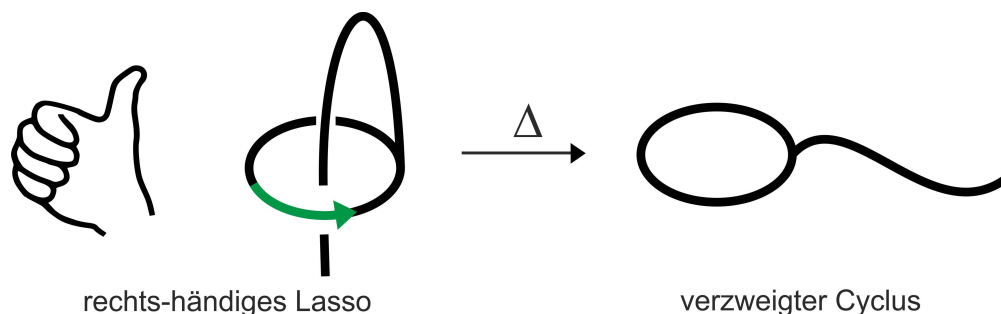
### 1.1.2 Nomenklatur von topologischen Isomeren

Eine korrekte und einfache Nomenklatur von topologischen Isomeren ist anspruchsvoll und nicht leicht zu realisieren. Neben einfachen Verbindungen wie [2]Rotaxanen oder [2]Catenanen, die eindeutig beschrieben werden können, erfordert beispielsweise die hohe Komplexität von mehrfachen Rotaxanen und Catenanen eine sehr genaue und eindeutige Nomenklatur, um Verwechslungen zu vermeiden. Bereits 1971 stellte SCHILL einen ersten Vorschlag zur Nomenklatur auf.<sup>[24]</sup> VÖGTLE et al. führte 2000 eine Erweiterung dieser Regeln ein und 2009 wurde eine Nomenklatur-Empfehlung der IUPAC herausgegeben.<sup>[25,26]</sup> Im Fall von Knotanen, die chirale topologische Isomere und kein konventionelles Stereozentrum aufweisen, wird die Konfiguration der Überkreuzung mit den Indizes *p* (Plus) und *m* (Minus) angegeben, welche wie in Abbildung 1.5 definiert und am Beispiel eines Kleeblattknotens angewendet wurden.<sup>[25]</sup>



**Abbildung 1.5** Nomenklatur der zwei möglichen Überkreuzungen *p* (Plus) und *m* (Minus) für die Nomenklatur von Knoten. Zur Verdeutlichung ist ein Beispiel des links-händigen Kleeblattknotens  $3_1^{mmm}$  gezeigt.<sup>[25,27]</sup>

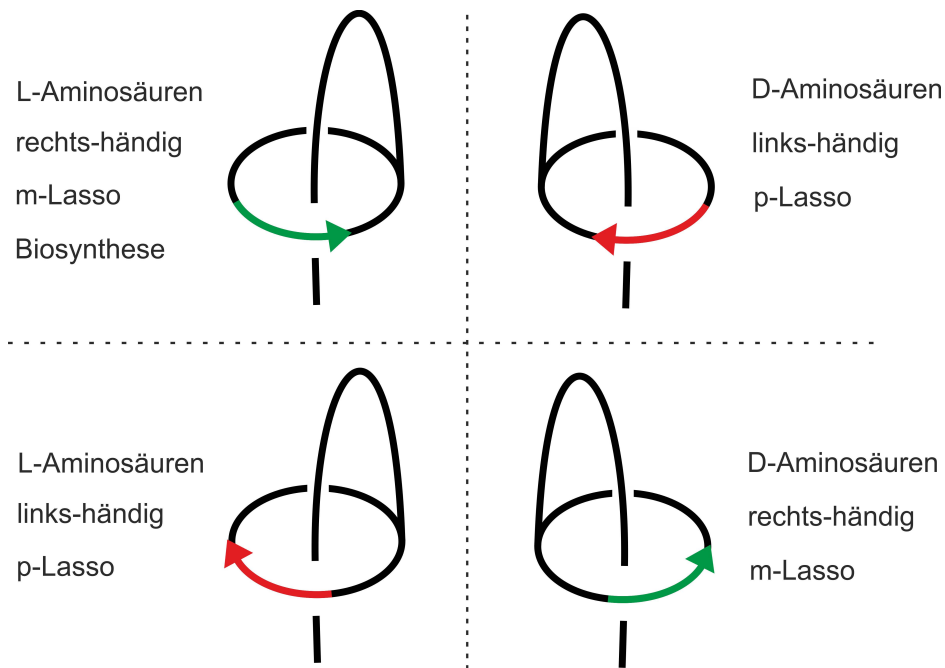
Lasso peptide, deren Synthese, Struktur und biologische Aktivität in Kapitel 1.3 näher erläutert werden, können mit der bereits beschriebenen Nomenklatur benannt werden, aber aufgrund der möglichen Entfädelung stellen sie keine perfekten Knoten dar (siehe Abb. 1.6). Diese irreversible Entfädelung erfolgt bereits bei erhöhter Temperatur. Je nach Peptid reichen Temperaturen zwischen 80 und 90 °C, im Fall des Microcins J25 muss das Peptid über 115 °C erhitzt werden.<sup>[28]</sup>



**Abbildung 1.6** Schematische Darstellung eines rechts-händigen Lasso peptides, das durch Biosynthese entsteht und thermisch entfädelt werden kann. Der Prozess der irreversiblen Entfädelung kann mittels NMR-Spektroskopie, HPLC oder Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie verfolgt und analysiert werden.



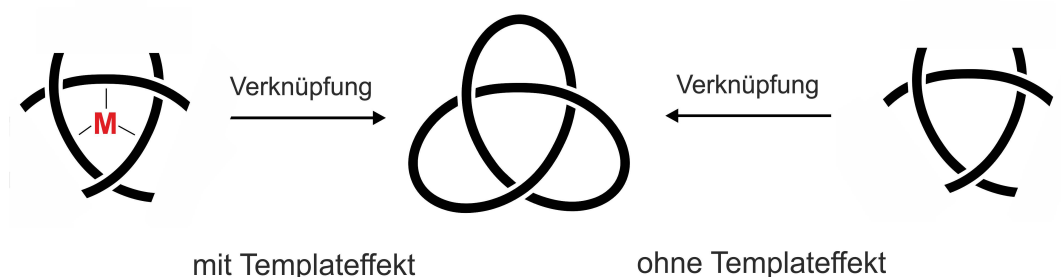
Durch die gerichtete Peptidbindung wird diese Peptidklasse in links- und rechts-händige Lasso-peptide eingeteilt, die topologische Isomere darstellen. In der Biosynthese werden lediglich rechts-händige Strukturen mit natürlichen L-Aminosäuren synthetisiert. Die umgekehrte Einfädelung des C-Terminus, die zur links-händigen Struktur führt wurde noch nicht beobachtet. Durch die formale Invertierung aller Stereozentren, kann ein D-Aminosäure-Derivat erhalten werden, welches links-händig wäre und dessen umgekehrte Einfädelung zu einem rechts-händigen Lasso-peptide führen würde (Abb. 1.7).



**Abbildung 1.7** Schematische Darstellung von Lasso-peptiden, die eine Händigkeit aufweisen. Das biosynthetisch hergestellte Peptid links oben (grün) ist rechts-händig, weist eine m-Notation auf und gilt für sämtliche isolierte Lasso-peptide. Das Spiegelbild, welches aus D-Aminosäuren aufgebaut wäre, ist als topologisches Isomer rechts oben (rot) abgebildet. Es entspricht der p-Notation und konnte bisher nicht synthetisiert werden.

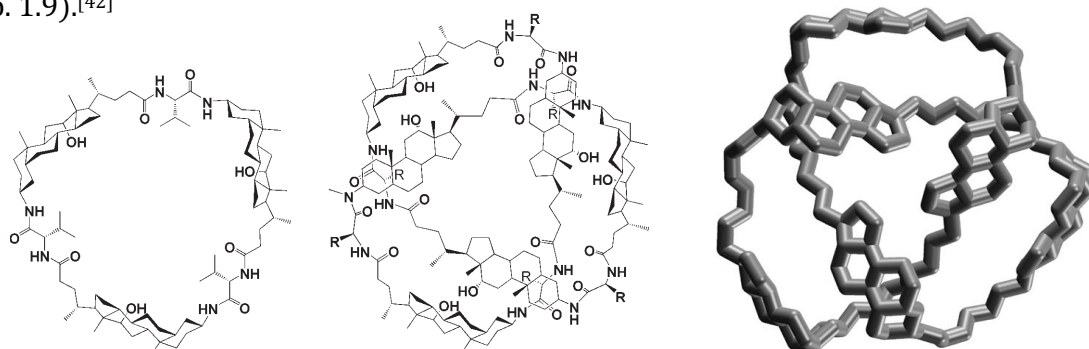
### 1.1.3 Synthesemethoden von topologisch anspruchsvollen Strukturen

Die Darstellung von topologisch gespannten Knotenstrukturen wie Rotaxanen, Catenanen, Kleeblattknoten oder Lassozeptiden ist eine synthetische Herausforderung und bedarf verschiedenster chemischer Methoden. Größere Strukturen, wie sie in der Natur zu finden sind, basieren auf dem Prinzip der supramolekularen Erkennung und werden äußerst selektiv synthetisiert.<sup>[29]</sup> Niedermolekulare Knoten, die nicht durch inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen eine verschlungene dreidimensionale Struktur einnehmen, können anhand von supramolekularen Templatetechniken erhalten werden.<sup>[30–34]</sup> Dieses Konzept wurde sehr erfolgreich in den Synthesen von Catenanen und Kleeblattknoten eingesetzt und ist in Abbildung 1.8 veranschaulicht.<sup>[32,35–37]</sup> Die erste Synthese eines solchen Kleeblattknotens gelang SAUVAGE 1989.<sup>[38]</sup>



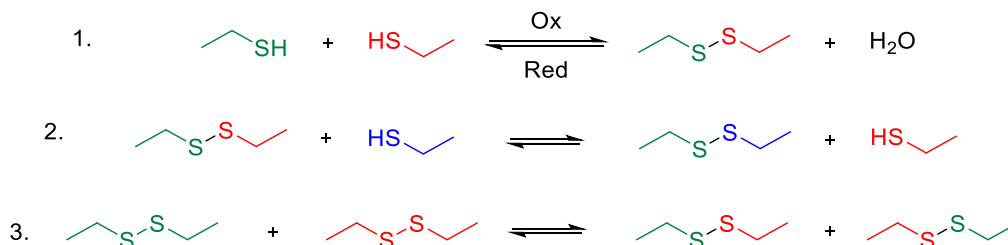
**Abbildung 1.8** Templat-gesteuerte Synthese eines Kleeblattknotens. Durch die symmetrische Koordination von drei identischen Strängen um ein zentrales Metallatom, wodurch ein oktaedrisch-kordinierter Komplex entsteht, kann mittels Verknüpfung durch kovalente Bindungen ein Kleeblattknoten selektiv dargestellt werden. Als Templat dienen häufig Übergangsmetall-Ionen wie  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^+$ .<sup>[35–37,39]</sup>

Templat-gesteuerte Synthesen ermöglichen die Synthese von noch komplexeren Strukturen wie dem molekularen Davidstern ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oder einem Salomonsknoten ( $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ).<sup>[40,41]</sup> FEIGEL et al. konnten zeigen, dass komplexe, topologisch anspruchsvolle Strukturen wie der Kleeblattknoten durch molekulare Erkennung synthetisierbar sind (siehe Abb. 1.8 und Abb. 1.9).<sup>[42]</sup>



**Abbildung 1.9** Durch Fragment-Kondensation von  $\alpha$ -Aminodesoxycholsäure- und Valin-Einheiten werden Macrolactame erhalten, die je nach Konzentration einfache Ringe bilden (links) oder einen Kleeblattknoten (mitte). Durch Kristallstrukturanalyse wurde die Topologie des entstandenen Knotens eindeutig bewiesen (rechts). Entnommen aus M. Feigel, R. Ladberg, S. Engels, R. Herbst-Irmer, R. Fröhlich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5827–5831.<sup>[42]</sup>

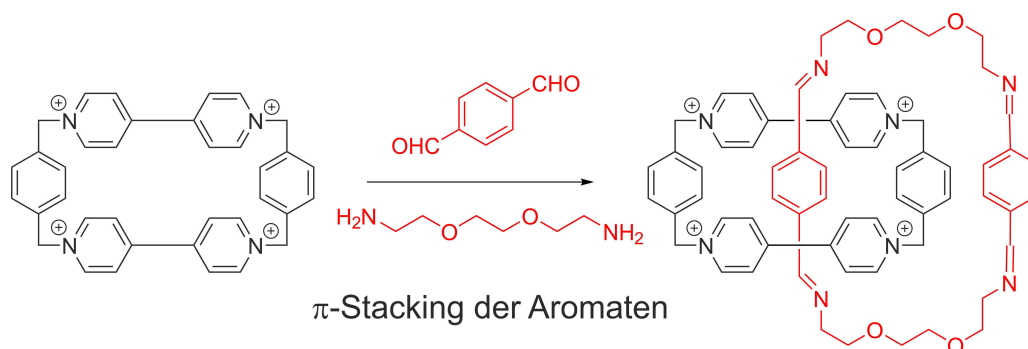
Erreicht wird diese Struktur durch alternierende Fragment-Kondensationen zwischen  $\alpha$ -Aminodesoxycholsäure- und Valin-Einheiten.<sup>[42]</sup> Neben den von Übergangs-Metallionen gelenkten Synthesen können topologische Isomere über dynamisch-kovalente Chemie reversibel als Imine oder Disulfide dargestellt werden. Unterschieden wird in beiden Fällen in drei Reaktionstypen der Gleichgewichtseinstellung, die am Beispiel der Disulfide veranschaulicht werden (siehe Abb. 1.10).<sup>[43]</sup>



**Abbildung 1.10** Differenzierung der drei Reaktionstypen in der Gleichgewichtseinstellung veranschaulicht am Beispiel der Disulfidbrücke. Gezeigt sind die Bildung/Spaltung (1), das *disulfid-reshuffling* (2) und die Metathese-Reaktion (3). Die Imin-Chemie kann analog betrachtet werden.<sup>[43]</sup>

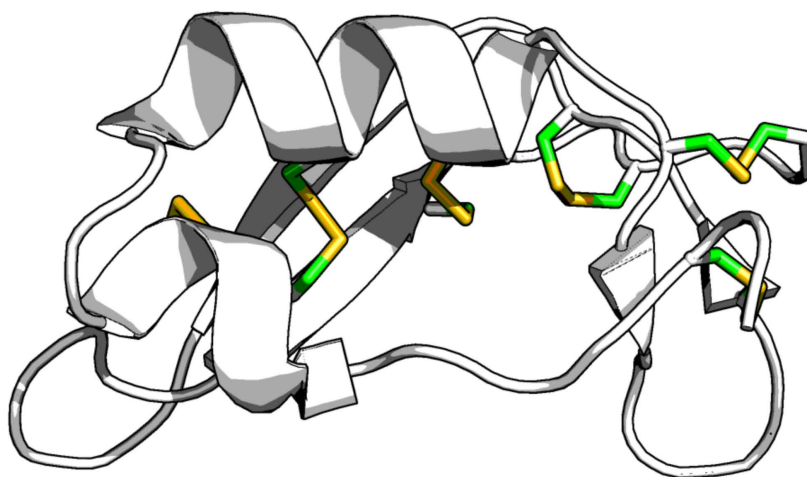
Im ersten Fall kommt es zur Bildung der entsprechenden kovalenten Bindung oder Spaltung. Im zweiten Fall kann ein Austausch erfolgen, indem eine bestehende Bindung partiell substituiert und ein Bindungspartner freigesetzt wird. Im letzten Fall findet eine Metathese von zwei Bindungen statt, in der jeweils ein Rest übertragen wird. Sämtliche Reaktionen verlaufen reversibel und stehen zusätzlich untereinander im Gleichgewicht.<sup>[43]</sup>

In beiden funktionellen Gruppen, Imine und Disulfide, können je nach Komplexität der Strukturen regio- sowie chemoselektive Syntheseprobleme auftreten. Die kontrollierbare Reversibilität von Iminen ermöglicht eine Vielzahl an komplexen Strukturen, die im Gleichgewicht aufgebaut werden können. Beispiele dafür sind erneut Catenane und Rotaxane, die durch molekulare Erkennung synthetisiert werden (siehe Schema 1.1).<sup>[44]</sup>



**Schema 1.1** Synthese eines [2]Catenans durch Kondensation zweier Terephthal-Aldehyden (rot) mit zwei Diaminen (rot). Die molekulare Erkennung erfolgt durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Pyridinium-Einheiten (schwarz) und dem Terephthal-Aldehyd. Als Gegen-Ion wurde  $\text{PF}_6^-$  eingesetzt.<sup>[44]</sup>

Durch Reduktion der Imin-Bindungen solcher Strukturen lassen sich diese fixieren und können nicht mehr hydrolysiert oder substituiert werden. Die regioselektive Bildung von Disulfidbrücken innerhalb von Peptiden und Proteinen als Mittel zur topologischen Fixierung von Strukturen wird besonders ausgiebig in der Natur und vermehrt im Labor eingesetzt. Ribonuclease A und Echistatin mit vier Disulfidbrücken, Conotoxine mit drei Disulfidbrücken und Defensine mit bis zu sechs Disulfidbrücken sind nur vier von unzähligen Peptiden/Proteinen, die eine kompakte dreidimensionale Struktur aufweisen, welche eine bestimmte biologische Aktivität induziert. Ein bemerkenswertes Beispiel von Regio- und Chemo-selektivität im Rahmen der Defensine ist die Biosynthese des antimikrobiellen Proteins Copsin, das bei einer Sequenz von 57 Aminosäuren (XNCPTRRGLCVTSGLTACRNHCRSCHRGDVGCVRCSNAQCTGFLGTTCTCINPCPRC, mit X = Pyroglutaminsäure) sechs Disulfidbrücken aufweist, was einem Cystein-Anteil von über 21% entspricht (siehe Abb. 1.11). Das Protein zeigt eine hohe Stabilität sowie biologische Aktivität gegenüber *gram*-positive Bakterien und Listerien auf.<sup>[45,46]</sup>



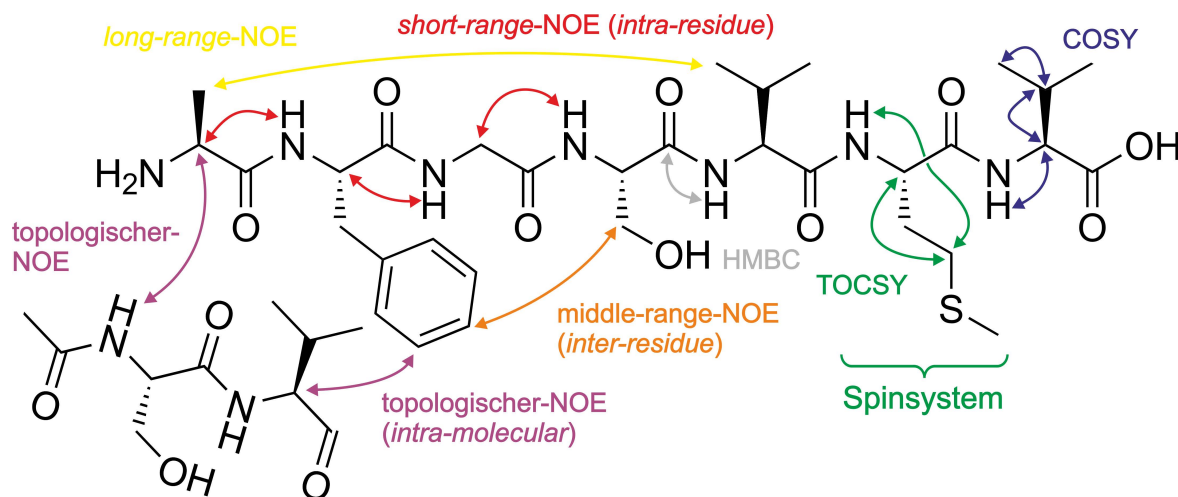
**Abbildung 1.11** Energieminimierte dreidimensionale Darstellung des Proteins Copsin, basierend auf dem PDB-Code 2MN5.<sup>[46]</sup> In gelb dargestellt sind die sechs Disulfidbrücken, welche die kompakte Struktur zusammenhalten. Interessant ist die hohe Regio-selektivität im Rahmen der Bildung der Disulfide.

Die auf der dreidimensionalen Struktur beruhende hohe thermische und proteolytische Stabilität sowie die biologische Aktivität werden ebenfalls in antimikrobiellen, von Bakterien produzierten Lasso-peptiden, gefunden. Die gerichtete Synthese von korrekt eingefädelten Lasso-peptiden wird auf dem Biosyntheseweg von *gram*-negativen Bakterien durchgeführt und ist in weiten Gebieten sehr gut verstanden (siehe Kap. 1.3.2). Eine Totalsynthese, die auf organisch-synthetischen Methoden basiert, konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. SOUDY et al. versuchten nach der Festphasensynthese des linearen Vorläufers ein korrekt gefaltetes Microcin J25 mit Hilfe einer Disulfidbrücke darzustellen und substituierten

in weiteren Derivaten den N-terminalen Lactamring durch eine Disulfidbrücke, ebenso wie HAMMAMI et al. Disulfide zur Stabilisierung von Microcin J25 Derivaten nutzten.<sup>[47,48]</sup> FERGUSON et al. wendeten für die Cyclisierung Click-Chemie an, um ein eingefädelt Lasso-peptid zu erhalten.<sup>[49]</sup> Sämtliche Experimente und Untersuchungen zeigten, dass die synthetisierten Derivate des Microcins J25 keine korrekte Topologie besitzen. Es wurden lediglich verzweigt-cyclische Peptide erhalten, die eine wesentlich geringere biologische Aktivität gegenüber *gram*-negativen Bakterien aufweisen.<sup>[47–49]</sup>

#### 1.1.4 Strukturaufklärung und Differenzierung von Topologien

Zur Aufklärung der topologischen Strukturen müssen Analysemethoden angewendet werden, welche die räumliche Anordnung der Atome vermessen und darstellen können. Durch Kristallisation der entsprechenden Verbindungen kann mittels Kristallstrukturanalyse ein sehr genauer Einblick in die Struktur erhalten werden. In vielen Fällen ist die Kristallisation von Peptiden/Proteinen nicht trivial, wodurch eine Strukturaufklärung in Lösung über NMR- oder CD-Spektroskopie erfolgen muss. CD-Spektroskopie wird vor allem bei größeren Strukturen interessant, die sich nicht mehr eindeutig durch NMR-Spektroskopie zuordnen lassen. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich 2D-NMR-spektroskopische Methoden wie TOCSY, HSQC, HMBC und ROESY/NOESY-Experimente angewendet. Diese ermöglichen je nach Faltungsgrad des Peptids eine genaue Strukturanalyse.



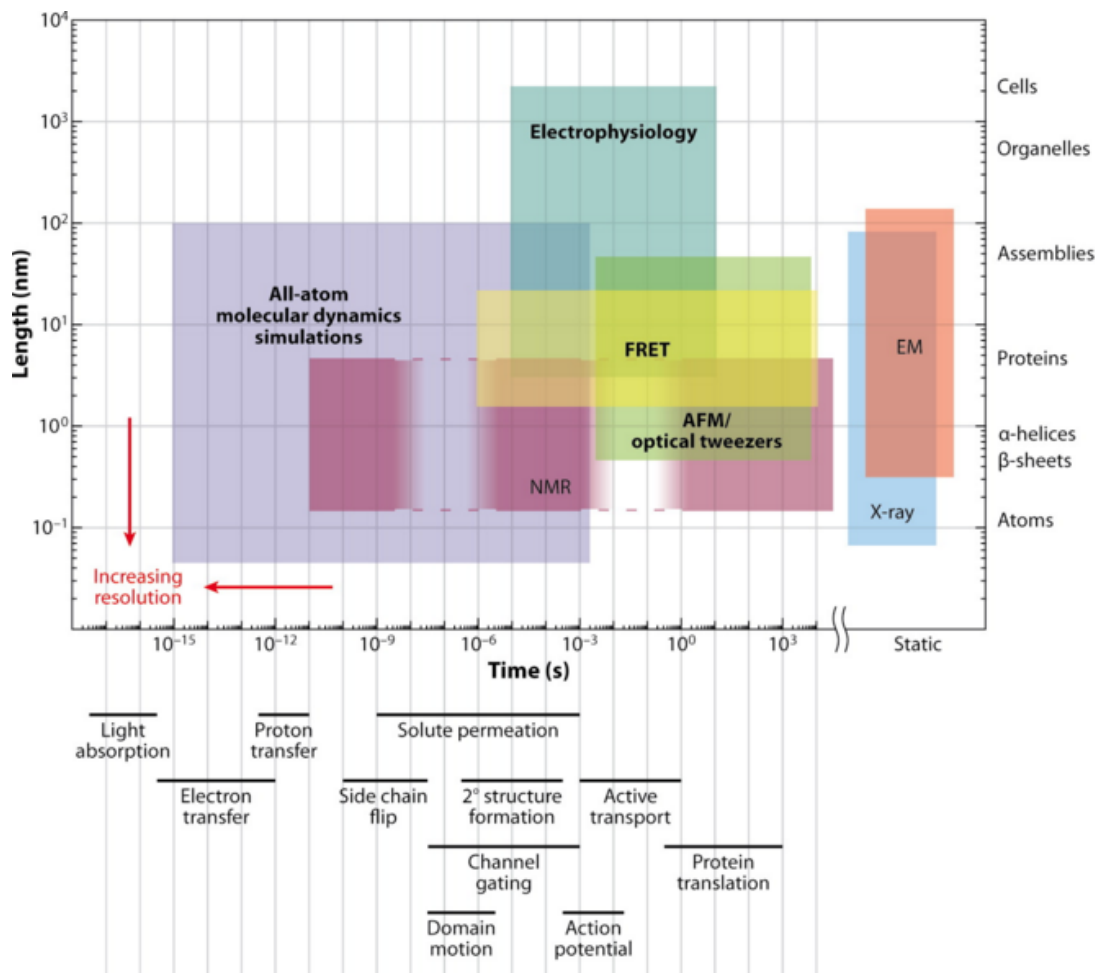
**Abbildung 1.12** Strukturaufklärung von Peptiden/Proteinen anhand der NMR-spektroskopischen Experimente COSY, TOCSY, HMBC und NOESY veranschaulicht an einem Modellpeptid. Im COSY-Experiment (blau) werden nur skalare  $^3J$ -Kopplungen gemessen, hingegen können in TOCSY-Experimenten (grün) skalare Kopplungen über das gesamte Spinsystem detektiert werden. Beides dient primär zur Zuordnung der Signale. Im HMBC-Spektrum können  $^2,4J$ -Kopplungen beobachtet werden, die sich über zwei Spinsysteme erstrecken können. In grau dargestellt ist eine sogenannte sequentielle  $^2J$ -Kopplung über die Amidbindung. In NOESY-Experimenten werden dipolare Kopplungen über den Raum detektiert. Dabei werden die meisten Informationen bezüglich der Struktur erhalten. Dargestellt sind sequentielle (rot), *middle-range* (orange), *long-range* (gelb) und topologische NOE-Kontakte. Topologische NOEs sind *long-range* NOE-Kontakte, die auf eine besondere räumliche Anordnung zurückzuführen sind.

Durch Anwendung von  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Markierung ist die Analyse von größeren Peptiden, bzw. Proteinen möglich.<sup>[50]</sup> Bei TOCSY, HSQC und HMBC-Experimenten werden skalare Kopplungen gemessen, welche für die Zuordnung der Signale verwendet werden können und noch keine Informationen über die räumliche Struktur liefern (siehe Abb. 1.12). Vor allem ROESY/NOESY-Experimente sind, basierend auf dem *Nuclear Overhauser Effect* (NOE), ein gutes Werkzeug zur räumlichen Charakterisierung von Strukturen. Bei dieser Messung werden die dipolaren Kopplungen von zwei Protonenkernen nicht skalar sondern durch den Raum gemessen. Die Magnetisierung wird in diesem Fall nicht über die Bindungen transferiert und somit werden Informationen über die dreidimensionale Struktur erhalten. Das Ergebnis des Experiments ist stark von der gewählten Mischzeit abhängig und die Intensität des jeweiligen NOE-Kontakts nimmt mit der sechsten Potenz des Kernabstands ab. Es werden schwächere (großer Abstand) und stärkere (kurzer Abstand) Kreuzsignale detektiert, die mit Hilfe eines genau bestimmbar Abstandes, oft vicinale aromatische Protonen oder diastereotope Methylengruppen, quantifiziert werden können. NOE-Kontakte können klassifiziert und in sequenzielle, *middle-range* oder *long-range* Kontakte innerhalb des Peptids unterteilt werden. In den sequenziellen Kontakten zeigt das  $\alpha\text{-H}$  in der *i*-Position einen Kontakt zum NH der *i+1* Position. Zur Charakterisierung der vorliegenden Struktur sind vor allem die *middle*- und *long-range* Kontakte von Bedeutung, die sequentiellen NOEs dienen lediglich zur Bestätigung der entsprechenden Primärsequenz sowie zur Zuordnung der Signale (siehe Abb. 1.12).

Zur Identifizierung von Wasserstoffbrücken der amidischen Protonen werden  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und die Temperaturabhängigkeit der NH-Signale in ppb/K bestimmt.<sup>[51]</sup> Amidische Protonen, die Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel und nicht intramolekular zu einem Protonenakzeptor ausbilden, zeigen eine höhere Temperaturabhängigkeit (zwischen -5 und -10 ppb/K) basierend auf der freiwerdenden Entropie.<sup>[52,53]</sup> Wasserstoffbrücken, die intramolekular zwischen amidischen Protonen und Carbonyl-Gruppen ausgebildet werden, weisen eine geringe Temperaturabhängigkeit auf, die sehr stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängt. Bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel kann von einer intramolekularen Wasserstoffbrücke ausgegangen werden, wenn der Temperaturgradient einen Wert um -2 ppb/K aufweist.<sup>[52]</sup> Erhöht sich die Abhängigkeit der Temperatur, wird ab einem Wert von -4 ppb/K eine Orientierung zum Lösungsmittel wahrscheinlicher. In wässrigen Lösungen verschiebt sich diese Grenze nach oben. Bei einer Temperaturabhängigkeit von -4 ppb/K kann noch von einer intramolekularen Wasserstoffbrücke ausgegangen werden.<sup>[54,55]</sup>

Die Differenzierung von zwei oder mehreren Topologien kann mittels Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie (IMS) erfolgen, wenn sich die topologischen Isomere ausreichend in der räumlichen Struktur unterscheiden.<sup>[56–58]</sup> Die ionisierte Probe wird durch ein Trägergas geleitet und durch Kollisionen der Ionen mit dem Gas werden die Analyten, abhängig von der Größe, unterschiedlich stark abgebremst. Kleine Moleküle erfahren damit eine geringfügig höhere Driftgeschwindigkeit und können von größeren Molekülen, welche dieselbe Masse aufweisen, unterschieden werden. Durch die Kopplung eines IMS mit einem Massenspektrometer (IMS-MS), beispielsweise durch Elektrospray-Ionisation (ESI), kann zusätzlich die exakte Masse der Analyten bestimmt werden.<sup>[57–59]</sup>

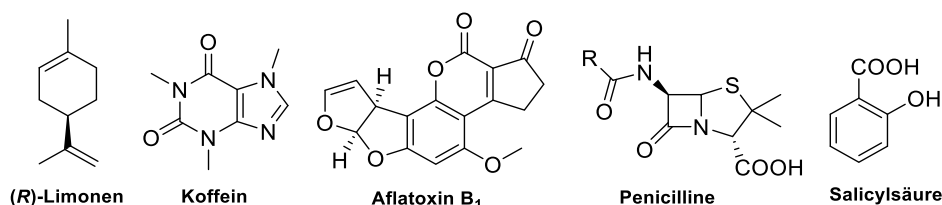
In Abbildung 1.13 sind gängige biophysikalische Messmethoden (NMR, X-ray, Elektronenmikroskopie, FRET und AFM) zusammengefasst, die im Rahmen der Strukturaufklärung verwendet werden. Sie werden bezüglich ihrer Zeitskala und der räumlichen Auflösung verglichen.<sup>[60]</sup>



**Abbildung 1.13** Raumzeitliche Auftragung von unterschiedlichen biophysikalischen Messmethoden. Die jeweiligen Messtechniken sind durch farbliche Boxen hervorgehoben. Techniken, die Informationen über ein einzelnes Molekül liefern, sind fett geschrieben. Auf der Zeitskala gesehen, deckt die NMR-Spektroskopie den größten Bereich ab. Zusätzlich ist unterhalb der Auftragung die Zeitskala von grundlegenden molekularen und physiologischen Prozessen dargestellt. Entnommen aus: O. Dror, R. M. Dirks, J. P. Grossmann, H. Xu, D. E. Shaw, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 429-452.<sup>[60]</sup>

## 1.2 Organische und peptidische Naturstoffe

Naturstoffe sind chemische Moleküle, welche von in der Natur vorkommenden und lebenden Organismen, meist Pflanzen, Bakterien oder Pilze, produziert werden.<sup>[61]</sup> Sie können in die verschiedenen chemischen Stoffklassen der Terpene, Alkaloide, Steroide, Polyketide, Peptide, Kohlenhydrate, Fettsäuren etc. eingeteilt werden.<sup>[62]</sup> In einigen Fällen weisen Naturstoffe eine biologische Aktivität oder pharmakologische Wirkung auf, die sie insbesondere für medizinische Applikationen interessant machen. Basierend auf ihrer meist hohen Komplexität können Naturstoffe selektiv als potente Wirkstoffe in der modernen Medizin verwendet werden, stehen dafür aber oft nur in begrenzter Menge zur Verfügung. Ca. 60% der zur Zeit zugelassenen Medikamente basieren auf Naturstoffen oder deren Derivaten.<sup>[63]</sup> Penicillin als ältestes, aber noch verwendetes Antibiotikum<sup>[64]</sup> oder Cyclosporine als Immunsuppressiva, die in der Transplantationsmedizin verwendet werden,<sup>[65]</sup> sind nur zwei von unzähligen Beispielen von Naturstoffen, die ohne weitere Derivatisierung Anwendung finden (Abb. 1.14).

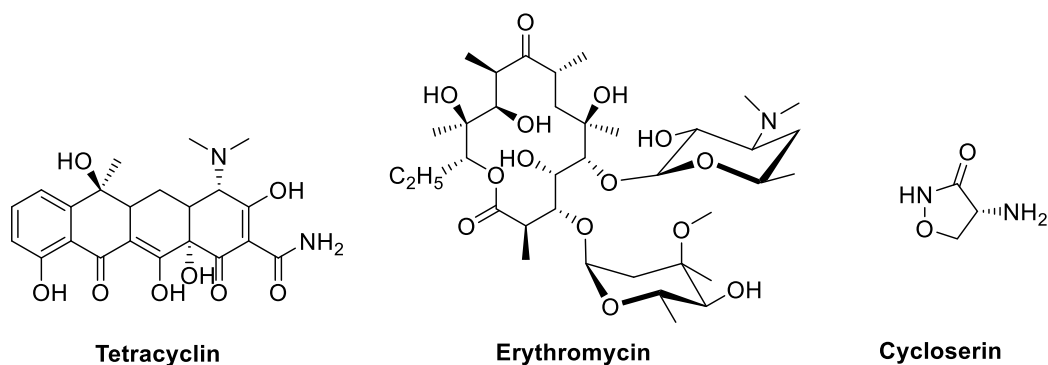


**Abbildung 1.14** Verschiedene Naturstoffe aus den Stoffklassen der Terpene ((R)-Limonen), Alkaloide (Koffein), Polyketide (Aflatoxin B<sub>1</sub>) und Peptide (Penicilline). Zur Vollständigkeit fehlen Beispiele der Lipide, Kohlenhydrate und Fettsäuren. Synthetisiert werden Naturstoffe durch Pilze (z.B. Aflatoxine), Bakterien (z.B. Penicilline) oder Pflanzen (z.B. Salicylsäure).

In der organischen Chemie gilt es daher als eine Herausforderung Naturstoffe durch chemisch-synthetische Methoden darzustellen und somit die oft komplexen Strukturen, die nach der Isolierung postuliert werden, zu bestätigen. Beispiele von interessanten Totalsynthesen sind Paclitaxel (Taxol) oder Vinorelbin, die als Zytostatika genutzt werden.<sup>[66–69]</sup> Naturstoffe können direkt als Medikamente verwendet werden oder als Grundlage für neue Medikamente dienen. Diese Art der Medikamentenentwicklung gewinnt in den letzten Jahren mehr und mehr an Zuspruch und stellt einen großen Forschungsbereich in der medizinischen Chemie dar.<sup>[70–72]</sup> Als bekanntestes Beispiel dient Aspirin, mit Salicylsäure als Naturstoff-Grundkörper. Durch Extraktion von Weidenrinde wurde Salicylsäure bereits von HIPPOKRATES als Arznei verwendet.<sup>[73]</sup> Aufgrund zu hoher Nebenwirkungen sowie Magenbeschwerden wurde gegen Ende des 18. Jahrhunderts durch Acetylierung eine Derivatisierung durchgeführt, die den Naturstoff 1977 auf die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO brachte.<sup>[74,75]</sup>



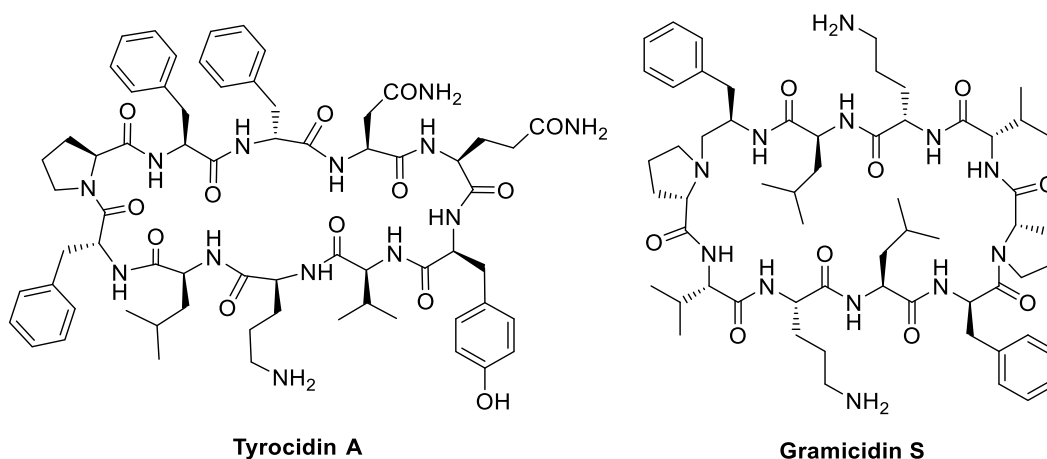
Antibiotika, wie die bereits erwähnten Penicilline, sind ursprünglich niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Bakterien oder Pilzen, die bereits in niedriger Dosierung Mikroorganismen abtöten oder das Wachstum verhindern. Heutzutage wird der Begriff auf jegliche Substanzen mit antimikrobieller Wirkung ausgeweitet. Die Menschheit ist sehr stark auf die medizinische Versorgung durch die Pharma-Industrie angewiesen und stark von der Entwicklung von hoch effektiven und selektiven Medikamenten gegen bakterielle Infekte abhängig.<sup>[76]</sup> Ab der Entdeckung und Nutzung der Sulfonamide 1935 und der Penicilline 1940 konnten die Heilungschancen nach einer bakteriellen Infektion gesteigert werden.<sup>[77]</sup> In den nächsten Jahrzehnten konnten viele weitere Substanzklassen identifiziert werden, die als hochpotente Antibiotika gehandelt werden, wie beispielsweise die Polyketide, Makrolide, Tetracycline und vor allem im letzten Jahrzehnt die Oxazolidinone (siehe Abb. 1.15).<sup>[78]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass der Einsatz von Antibiotika unausweichlich zu einer Resistenzbildung führt und damit die Lebenszeit und Wirkung von Antibiotika-Klassen begrenzt ist, müssen stetig neue Substanzklassen/Angriffspunkte für Antibiotika entwickelt bzw. entdeckt werden.<sup>[79]</sup> Heutzutage sind nahezu alle Kulturen von *Staphylococcus*, die in Krankenhäusern vorkommen, resistent gegen Penicillin.<sup>[80,81]</sup> Dies stellt die pharmazeutische Industrie vor große Schwierigkeiten, da die Forschung und Entwicklung neuartiger Antibiotika stets aufwändiger wird. Einer von vielen Ansätzen ist die Modifizierung von Peptiden, welche bereits eine biologische Aktivität aufweisen. Die Nachteile von Peptiden sind der rasche proteolytische Abbau im Verdauungstrakt, eine kurze Halbwertszeit in der Zelle, zu hydrophile Eigenschaften, wodurch kaum physiologische Barrieren überwunden werden können, und eine zu hohe konformationelle Flexibilität.<sup>[82–84]</sup> Inhalt dieser Arbeit sind unterschiedlichste bioaktive Peptide dieser Art, weswegen auf die Rolle von Peptiden als Wirkstoffe in der Medizin genauer eingegangen wird.



**Abbildung 1.15** Antibiotisch wirksame Naturstoffe und deren Struktur. Beispielhaft gezeigt sind Antibiotika der Tetracyclin-, Makrolid- und Oxazolidinon-Klasse. Tetracycline und Erythromycin inhibieren die Proteinbiosynthese, Cycloserin wird als D-Enantiomer in der Behandlung von Tuberkulose eingesetzt, wenn sich bereits Resistenzen gegenüber konventionellen Breitbandantibiotika wie Penicillin gebildet haben.

### 1.2.1 Antibiotische und antimikrobielle Peptide

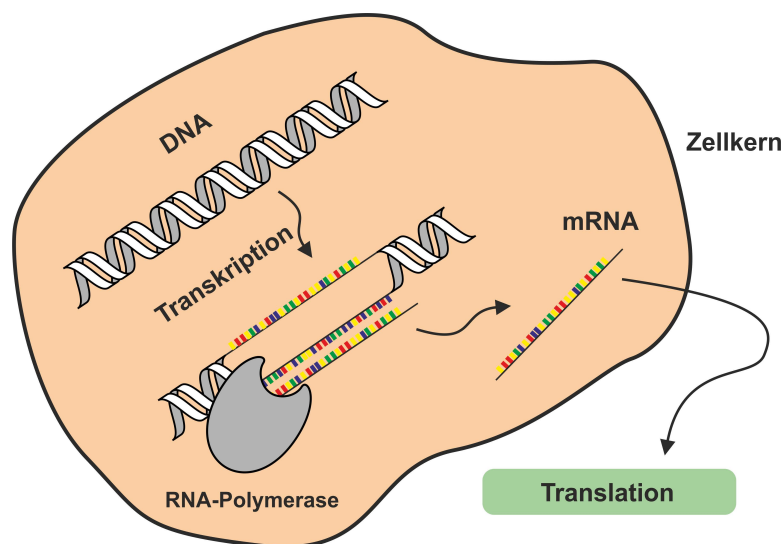
Niedermolekulare Verbindungen, die in ihrem Strukturmotiv stark mit natürlichen Peptiden bzw. Proteinen vergleichbar sind und ähnliche biologische Eigenschaften besitzen, werden in dem Überbegriff Peptidmimetika zusammengefasst. Vorteile gegenüber natürlichen Peptiden sind die pharmakokinetischen Eigenschaften, die höhere Bioverfügbarkeit und bessere Stabilität gegenüber Hydrolyse bzw. ihre längere Wirkungsdauer.<sup>[85–87]</sup> Ein weiterer Vorteil gegenüber *small molecule drugs* als Medikamente ist die höhere strukturelle Diversität der Verbindungen.<sup>[88]</sup> Die Entwicklung von Peptidmimetika basiert auf der Weiterentwicklung von peptidischen Grundstrukturen, die einen Pharmakophor besitzen, der eine hohe biologische Aktivität aufweist und dessen Umgebung optimierbar ist. Eine häufige Optimierung ist beispielsweise die Modifikation des Peptid-Rückgrats, wodurch die Verbindungen stabiler gegenüber dem Abbau durch Peptidasen sind.<sup>[89,90]</sup> Durch *High-Throughput-Screenings* (HTS) lassen sich hochpotente Wirkstoffe für viele Anwendungsbereiche (Antibiotika, ACE-Hemmer, HIV-Proteaseinhibitoren etc.) finden und entwickeln. Bekannte Vertreter von cyclischen Peptidantibiotika sind unter anderem Tyrocidine, Gramicidin S oder Cyclosporin A, die aus einem makrocyclischen Ring mit elf bzw. zehn Aminosäuren aufgebaut sind (siehe Abb. 1.16). Die Cyclisierung von solchen Peptiden ist nicht trivial und bedarf häufig, besonders im Fall des Gramicidin S, aufwendige und anspruchsvolle Methoden.<sup>[91]</sup>



**Abbildung 1.16** Darstellung der cyclischen Peptide Tyrocidin A und Gramicidin S als Bestandteile des Antibiotikums Tyrothricin. Das Gramicidin S kann über die Seitenkette des Ornithins derivatisiert werden. Im Fall der Tyrocidine werden oft ganze Aminosäuren substituiert. Tyrocidine sind zu 50 – 70% und Gramicidine zu 30 – 50% in Tyrothricin enthalten.

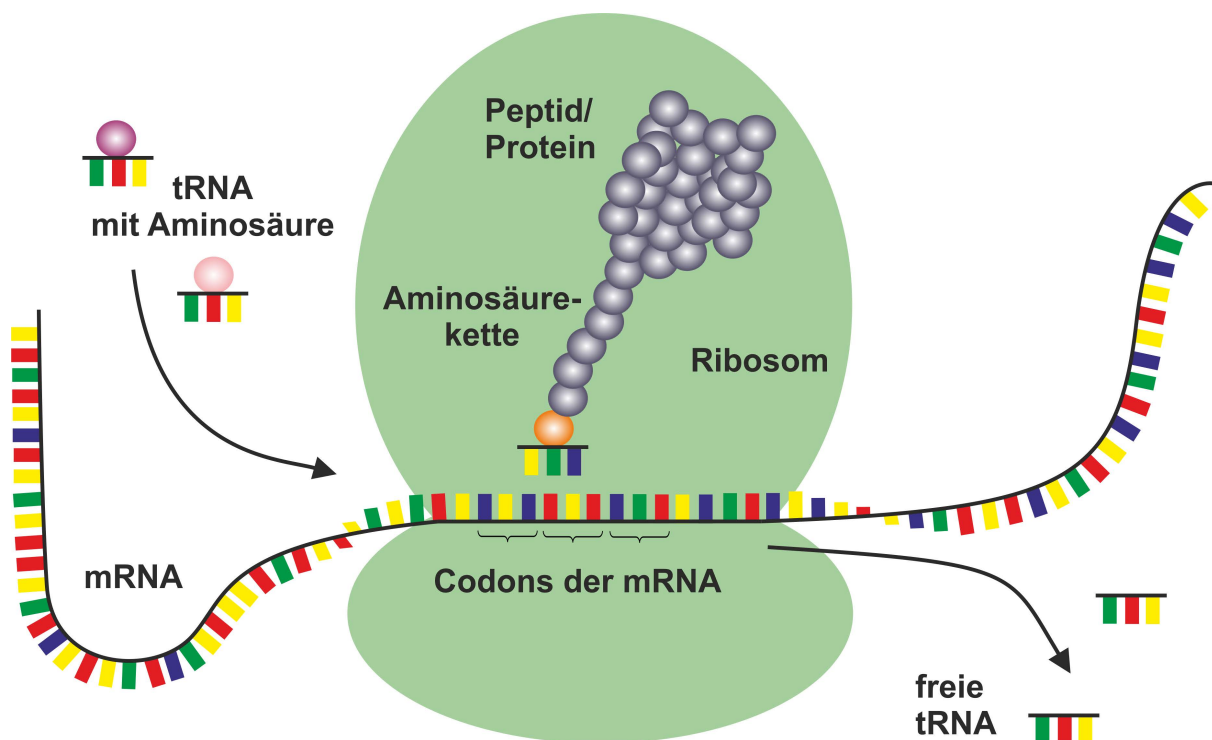
### 1.2.2 Ribosomale (RPS) und nichtribosomale Peptidsynthese (NRPS)

Die Biosynthese von Peptiden kann auf zwei voneinander unabhängigen Wegen erfolgen. Die ribosomale Peptidsynthese, welche auf die zwanzig proteinogenen Aminosäuren beschränkt ist und die nichtribosomale Synthese, bei der Peptide mittels verschiedener Enzyme synthetisiert werden. Im ersten Fall findet, wie der Name bereits impliziert, die Synthese an den Ribosomen statt. Diese kann vereinfacht in die Transkription und Translation unterteilt werden.<sup>[92–98]</sup> Die Transkription ist der erste Schritt der ribosomalen Peptidsynthese, bei der ein entsprechendes Gen aus der DNA (Desoxyribonukleinsäure, Doppelstrang) in eine mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure, Einzelstrang) transkribiert wird, damit anschließend die Information den Zellkern verlassen kann (siehe Abb. 1.17). Die RNA-Polymerase, als essentielles Enzym, ermöglicht die Transkription unter physiologischen Bedingungen. Zum Start der Transkription ist eine Promotor-Sequenz im codogenen Strang nötig, an welche die RNA-Polymerase binden kann. Promotoren sind Bereiche der DNA, die einen hohen Anteil an T- und A-Basen aufweisen, oft findet sich hierbei die Abfolge TATAAT. Dies liegt daran, dass T- und A-Basen nur zwei Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung ausbilden können, wodurch die Gesamtstabilität in diesem Bereich sinkt und die transkribierte Sequenz leichter abgelöst werden kann. An den Promotor folgt der Operator, durch den die Transkription gestartet und die Basen in die mRNA übersetzt werden. Durch Erreichen des Terminators wird die Transkription gestoppt und die Polymerase löst sich von der DNA, während sich die mRNA bereits im Laufe der Transkription von der DNA-Helix löst, da sich die Polymerase stets weiter bewegt.<sup>[92–98]</sup>



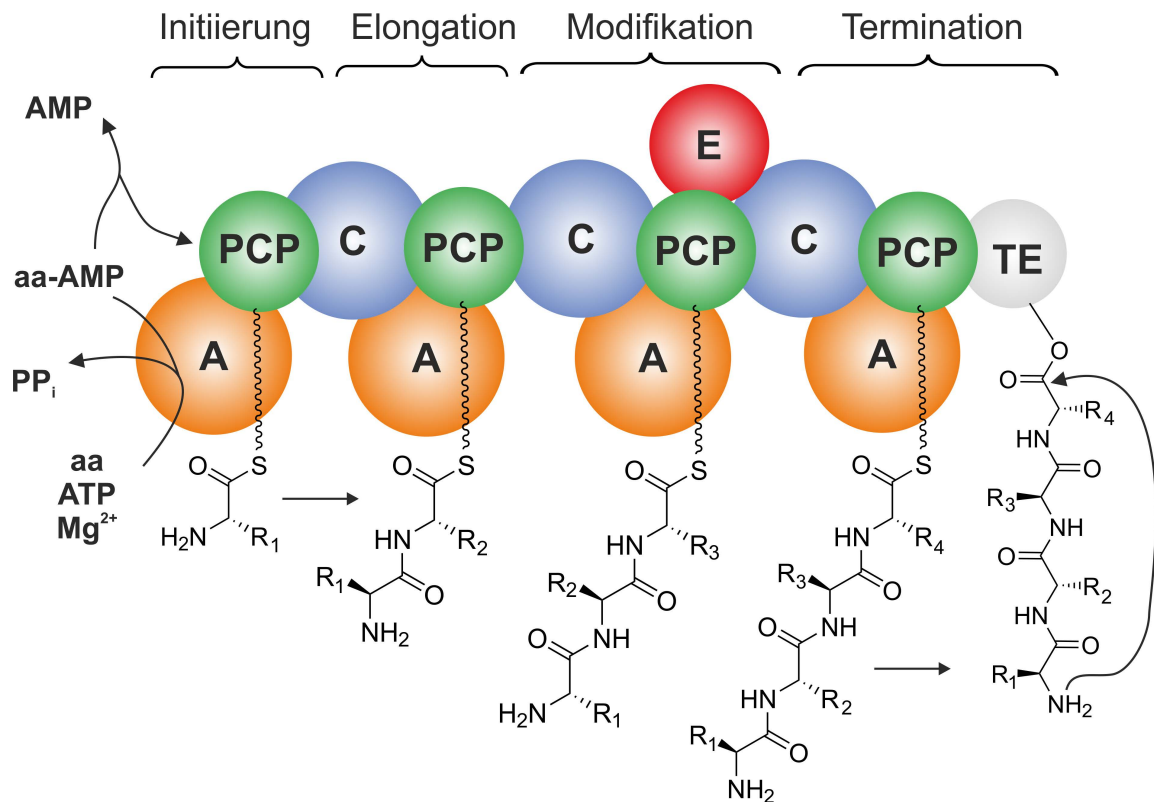
**Abbildung 1.17** Schematische Darstellung der Transkription. Als erster Schritt der Peptidbiosynthese wird ein entsprechender Ausschnitt der DNA in mRNA transkribiert, welche in der anschließenden Translation als Informationsträger für die tRNA dient. Durchgeführt wird die Transkription enzymatisch durch die RNA-Polymerase. In Eukaryoten findet die Transkription im Zellkern statt. Die synthetisierte mRNA muss daher aus dem Zellkern geschleust werden. In Prokaryoten findet die Transkription hingegen direkt im Zellplasma statt.<sup>[92–98]</sup>

Die Erbinformation ist in der transkribierten mRNA gespeichert und kann im nächsten Schritt in ein Peptid übersetzt werden. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet und ist in Abbildung 1.18 dargestellt. Dabei binden die beiden Ribosom-Untereinheiten an den Beginn der mRNA und ein funktionierendes Ribosom entsteht. Anhand von tRNA (*transfer* RNA) erfolgt die Anlagerung an das Startcodon AUG, wodurch jedes Peptid mit Methionin beginnt. Es folgt die Elongation, bei der die jeweils passende tRNA neben die vorherige Aminosäure (P-Stelle) an die mRNA (A-Stelle) gebunden und durch eine Peptidyltransferase die Peptidbindung geknüpft wird. Die leere tRNA des Methionins verlässt die mRNA, die Maschinerie wandert ein Basentriplett weiter und die nächste tRNA mit der entsprechenden Aminosäure kann angelagert werden. Dieser Prozess wiederholt sich solange bis ein Stoppcodon UGA erreicht wird, keine passende tRNA gefunden wird, der Komplex zerfällt und die Translation beendet wird. Die mRNA steht wieder für beide Ribosom-Untereinheiten sowie neue tRNA zur Verfügung und es können weitere Peptide synthetisiert werden. Post-translational können nachfolgend Modifikationen vorgenommen werden, wie die Entfernung der ersten Aminosäure Methionin (siehe Kapitel 1.2.3).<sup>[92-98]</sup>



**Abbildung 1.18** Schematischer Ablauf der Translation während einer Proteinbiosynthese. Die durch die Transkription synthetisierte mRNA bindet an ein Ribosom und durch das Startcodon AUG beginnt die Translation. Jede Aminosäure wird durch entsprechende Codons vertreten, welche die Aminosäuren nicht direkt erkennen können, da hierzu tRNA benötigt wird, die eine Bindungsstelle für die Aminosäuren aufweist. Die beladene tRNA bindet an die entsprechenden Codons und durch Peptidyltransferasen werden die Peptidbindungen geknüpft. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis ein Stoppcodon erreicht, keine passende tRNA gefunden wird, der Komplex zerfällt und die Translation beendet wird.<sup>[92-98]</sup>

Im Gegensatz zur bereits beschriebenen ribosomalen Peptidbiosynthese werden bei der zweiten Variante der natürlichen Peptid/Proteinbiosynthese, der nichtribosomalen Peptidbiosynthese, nichtribosomale Peptidsynthetasen verwendet.<sup>[98–104]</sup> Diese Klasse der Peptide wird von Bakterien und Pilzen synthetisiert und kommt ohne die Vorlage von mRNA aus. Dies hat zur Folge, dass nichtribosomal synthetisierte Peptide in vielen Fällen eine spezifische Funktion aufweisen und als Antibiotika, Siderophore, etc. verwendet werden.<sup>[105]</sup> Der Vorteil dieser Methode ist die große Diversität der Aminosäuren, da keine Vorgabe durch die mRNA und deren Basentriplets besteht. Neben den proteinogenen Aminosäuren können D-Aminosäuren,  $\beta$ -Aminosäuren und sogar Fettsäuren in die Synthese miteinbezogen werden. Die Liste dieser Bausteine beläuft sich laut der Datenbank NORINE mittlerweile auf 533 Verbindungen.<sup>[106,107]</sup>

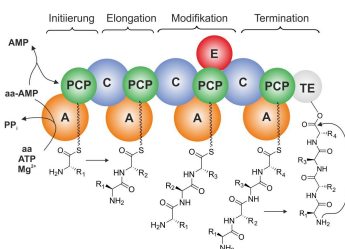


**Abbildung 1.19** Schematische Darstellung der nichtribosomalen Peptidsynthese. Zuerst wird die entsprechende Aminosäure als AMP-Ester durch die Adenylierungs-Domäne (A) voraktiviert, zur Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)-Domäne weitergeleitet und an eine dort gebundene Aminosäure durch die Kondensations-Domäne (C) gekuppelt. Nach vollständiger Elongation und eventueller Modifizierung wird das Peptid an die Thioesterase-Domäne (TE) in einer Umesterung gebunden. Diese katalysiert abschließend die Hydrolyse oder die Macrocyclisierung. Die Abbildung basiert auf M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20, 234-240 (Figure 1b).<sup>[100]</sup>

- 20 proteinogene Aminosäuren

**nichtribosomale**

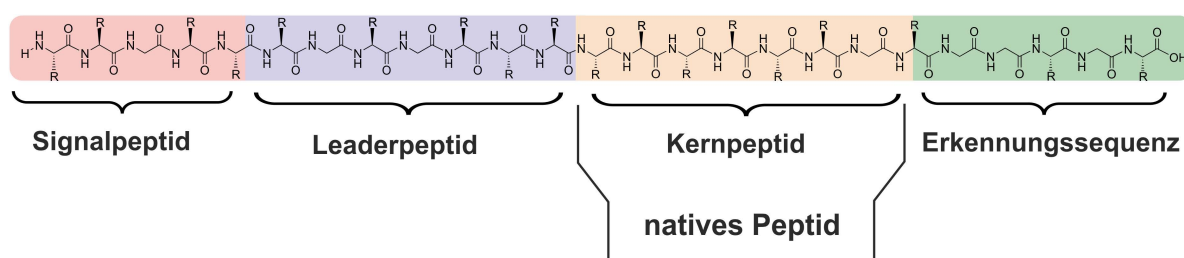
- **Synthese in Bakterien und Pilzen**



18

### 1.2.3 Ribosomal synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide

Wie bereits beschrieben, können nach der ribosomalen Peptidbiosynthese post-translational Modifizierungen (PTM) durchgeführt werden. Das sogenannte Vorläuferpeptid kann in maximal vier Segmente eingeteilt werden, dem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einem Leaderpeptid, dem Kernpeptid, das die Sequenz des finalen Peptids darstellt sowie einer Erkennungssequenz (siehe Abb. 1.21). Die Signalsequenz bestimmt primär den Zielort und den Transport, dem Leaderpeptid hingegen können diverse Aufgaben zugesprochen werden. Es kann als intramolekulares Chaperon, Erkennungssequenz für weitere Enzyme und Stabilisator dienen. Die Sequenz des Kernpeptids gleicht der Sequenz des nativen Peptids nach sämtlichen post-translationalen Modifikationen samt Freisetzung.<sup>[108–110]</sup>



**Abbildung 1.21** Schematische Darstellung eines nicht realen, ribosomal synthetisierten Peptids, das aus einem Signalpeptid, Leaderpeptid, Kernpeptid und einer Erkennungssequenz aufgebaut ist. Das Kernpeptid stellt nach den post-translationalen Modifikationen, der Hydrolyse sowie der Freisetzung das native Peptid dar.<sup>[108]</sup>

Aufgrund des geringen Pools von 20 Aminosäuren, die in der Synthese verwendet werden können, muss die Generierung von Diversität und zusätzlichen Funktionen der Peptide post-translational durchgeführt werden. Dazu hat der natürliche Syntheseapparat viele Seitenketten sowie Rückgrat-Modifikationen entwickelt. Zahlreiche Seitenkettenmodifikationen werden in Form von Acetylierungen, Methylierungen oder auch Eliminierungen realisiert.<sup>[111]</sup> Von Bedeutung für die Synthese von Lantibiotika sind Dehydratisierungen von Hydroxyl- und Thiolgruppen in der Seitenkette, wie es bei Serin, Threonin und Cystein der Fall ist. Durch Bildung einer Schiffsbasis mit Pyridoxalphosphat kann die Acidität des  $\alpha$ -Kohlenstoffs erhöht werden und die Aminosäuren eliminieren nach einem E<sub>2</sub>-Mechanismus. Zur Ausbildung der für Lantibiotika wichtigen Thioether, werden Thiolgruppen von Cysteinen an die dehydratisierten Aminosäuren addiert. Es entstehen bekannte Lantibiotika wie Nisin oder Subtilin.<sup>[112–114]</sup> Stark vertretende Modifikationen sind in Tabelle 1.1 dargestellt.<sup>[111,115,116]</sup> Interessant für diese Arbeit sind vor allem die selektive Reduktion von Seitenketten-Carboxylfunktionen sowie die oft in der organisch-synthetischen Peptidsynthese angewendete Disulfidbildung. Diese Art der Modifikation wird besonders häufig genutzt, um Peptide in ihrer Faltung zu unterstützen und

die biologisch aktive Konformation auszubilden. Beispiele für mehrfach disulfidverbrückter Peptide sind Cyclotide, Tachyplesin, Conotoxine oder Lasso peptide der Klasse I und III.<sup>[93,117–119]</sup>

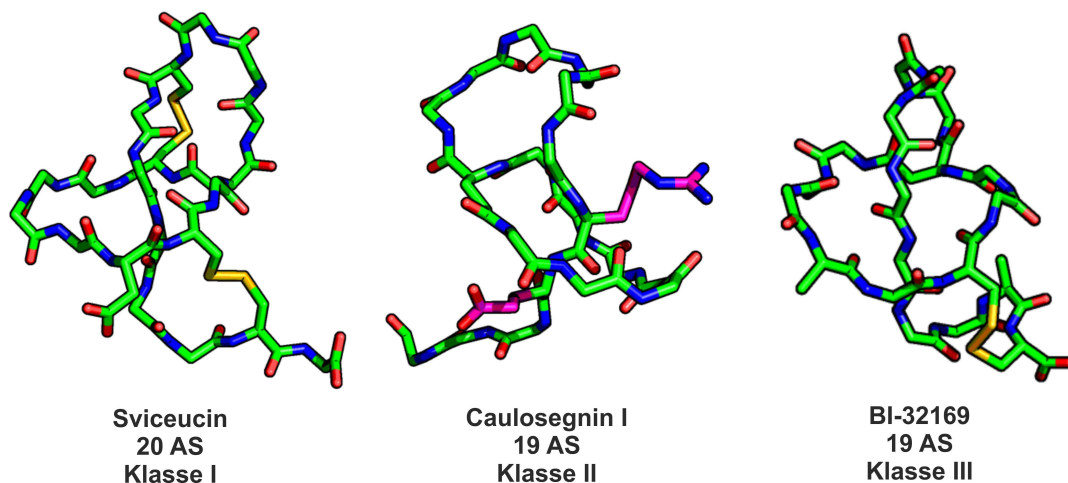
**Tabelle 1.1** Post-translationale Modifikationen der ribosomalen Peptidsynthese. Es werden nur die gängigsten Modifikationen, die entsprechenden Aminosäuren und die jeweiligen Peptide/Proteine aufgeführt.<sup>[93,117–119]</sup>

Modifikation	Aminosäuren	Peptid/Protein
Abspaltung von N-terminalen Aminosäuren	Formylmethionin/Methionin	allgemein
Methylierung	Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure	Histone, Myosin, Actin, Opsin
Phosphorylierung	Serin, Threonin, Tyrosin	Silaffin, Pepsin, Casein
Hydroxylierung	Prolin, Lysin	Kollagen
Sulfatierung	Tyrosin	
Acetylierung	Serin, Lysin,	Histone
Nicht-proteinogene Aminosäuresynthese	Arginin, Glutaminsäure	Filaggrine, Tyrocidine
Glycosylierung	Serin, Threonin, Hydroxylysin, Asparagin, Hydroxyprolin	Vancomycine, Teicoplanin, Telavancin
Disulfidverbrückung	Cystein	Conotoxine, Cyclotide, Defensine
Thioetherbildung	Cystein, Serin, Threonin	Nisin, Mersacidin
amidischer Ringschluss	Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin	Lasso peptide, Cyclosporine, Tyrocidine, Gramicidine



### 1.3 Lasso peptide

Lasso peptide bilden eine Gruppe aus Peptiden mit einzigartiger Topologie, die ribosomal von Bakterien synthetisiert und post-translational (RiPPs) modifiziert werden. Topologisch betrachtet bestehen diese Peptide aus einem N-terminalen Ring, durch den der C-terminale Teil des Peptides eingefädelt ist. Der C-Terminus kann durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten wie Aromaten (Phe, Tyr, Trp) oder aliphatische Reste (Ile, Arg) nicht-kovalent fixiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die kovalente Fixierung durch zusätzliche Disulfidbrücken. Lasso peptide haben eine Länge von 15 bis 24 Aminosäuren und weisen ein Molekulargewicht von 1500 bis 2500 Da auf. Der N-terminale Ring, der über eine Lactam-Bindung geschlossen wird, enthält zwischen sieben und neun Aminosäuren und wird zwischen der N-terminalen Aminosäure Gly oder Cys und der Seitenketten-Carboxylgruppe eines Glu oder Asp ausgebildet (Abb. 1.22).<sup>[47,120–123]</sup>



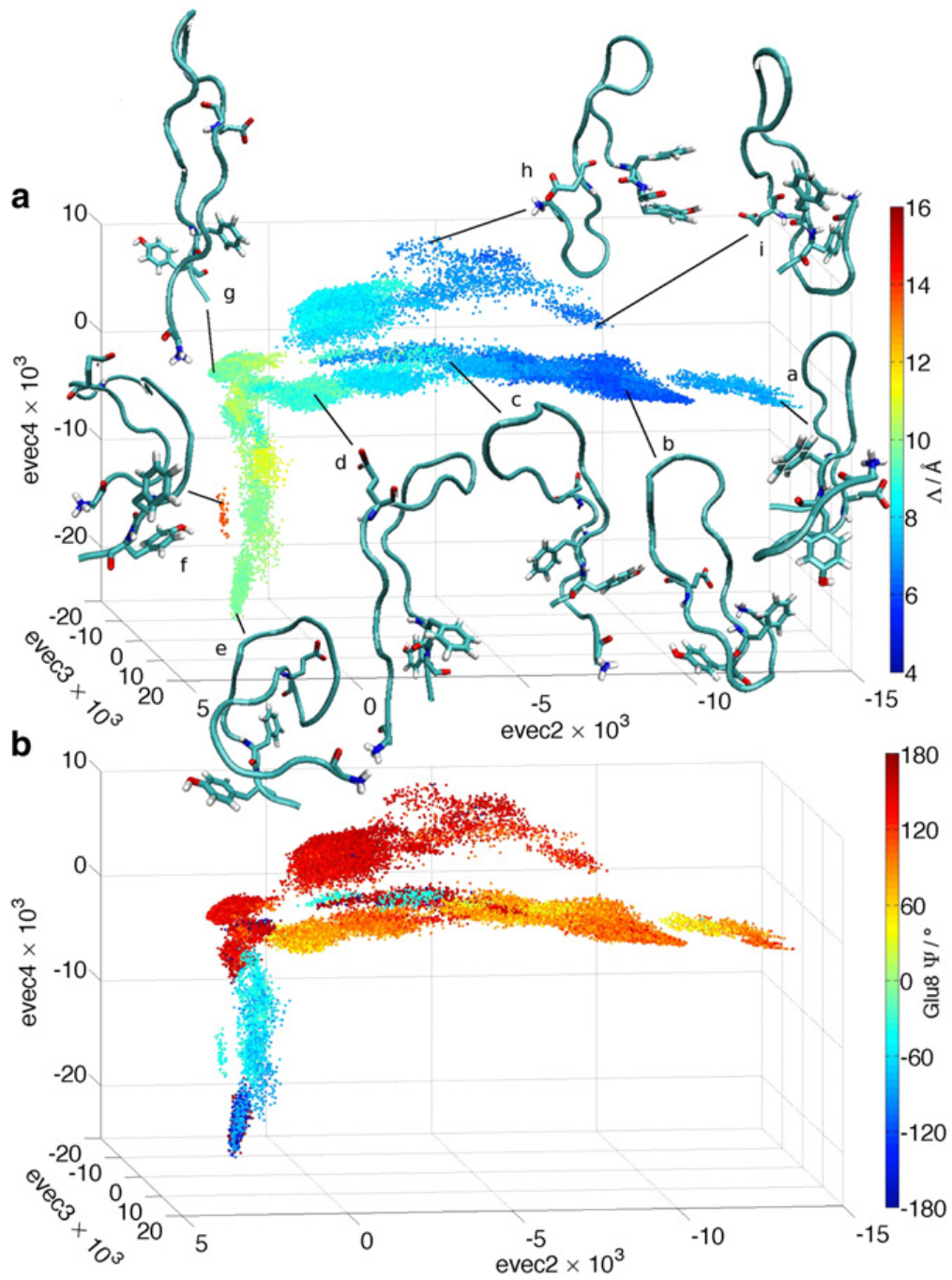
**Abbildung 1.22** Darstellung der Lasso peptide-Klassen I, II und III. Durch zweifache Disulfidverbrückung wird in Klasse I die Struktur stabilisiert. In Klasse II findet die Stabilisierung ausschließlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen statt und Klasse III nutzt eine Disulfidbrücke zur Fixierung der Lasso-Topologie. Vertreter dieser Klassen sind Svceucin (Klasse I), Caulosegnin I (Klasse II) und als einziger Vertreter der Klasse III BI-32169.<sup>[47,120–123]</sup>

Durch diese Lasso-ähnliche Struktur werden Peptide mit einer hohen thermischen sowie chemischen Stabilität, einer breiten biologischen Aktivität gegen Bakterien, Viren, Metastasen oder als Enzym-Inhibitoren und Rezeptor-Antagonisten, erhalten.<sup>[124]</sup> 1991 wurde mit Anantin das erste Lasso peptide entdeckt, das aus 17 Aminosäuren besteht und über die Seitenkette des Asparaginsäure cyclisiert ist.<sup>[125]</sup> Das erste Lasso peptide, für welches die Topologie eindeutig bestimmt werden konnte, ist Aborycin (RP-71955), das 1994 als anti-HIV Wirkstoff isoliert wurde.<sup>[126]</sup> Microcin J25 wird von *E. coli* Organismen produziert und ist das bislang am intensivsten untersuchte Lasso peptide. Es wurde bereits 1992 isoliert und lange kontrovers bezüglich der korrekten Topologie diskutiert, bis erstmals 2003 die richtige Struktur bestätigt werden konnte.<sup>[127–131]</sup>

Eine äußerst effiziente und erfolgreiche Methode um neue Lasso peptide zu entdecken und zu untersuchen ist die „Genome Mining“ Strategie, die gekoppelt mit modernsten Detektionsmethoden, die Entdeckung von fast einem Drittel der bis heute bekannten Lasso peptide ermöglichte.<sup>[123,132-136]</sup> Die ersten Forschungsschwerpunkte zielten auf die von Bakterien durchgeführte Faltung der Lassos<sup>[137-139]</sup> und die unterschiedlichen Aktivitätsmodi.<sup>[136,140]</sup> Mittlerweile liegt der Fokus entweder auf dem Biosyntheseweg und dessen post-translationalen Modifikationen oder auf der Entdeckung von neuen Lasso peptiden zum besseren Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehung.<sup>[132-134,136]</sup> Durch einzelne Substitutionen von Aminosäuren konnte im Fall des Microcins J25 gezeigt werden, dass bei bestimmten Variationen der Aminosäuren die Biosynthese, die Stabilität sowie die biologische Aktivität des Peptids erhalten bleibt.<sup>[141-143]</sup> Daraus folgte die Übertragung des Integrin-bindenden Motivs RGD in den Loop, wodurch ein nanomolarer Integrin-Antagonist erhalten wird und die Möglichkeit gegeben ist, Lasso peptide als Pharmakophore einzusetzen.<sup>[144]</sup>

Als weiteres aktuelles Forschungsziel gilt die Suche nach neuen, für die Vorfaltung der Lasso peptide benötigten Chaperone, die ein Indiz für die auftretende Händigkeit dieser Peptide liefern könnten. Alle Lasso peptide besitzen eine inhärente Chiralität (siehe Kap. 1.1.2) und sind rechtshändig, obwohl durch Molekulardynamik-Simulation (MD) gezeigt werden konnte, dass kein Energieunterschied besteht, der eine Bevorzugung zwischen rechts- und linkshändigen Lassos verursacht und erklären könnte (siehe Abb. 1.23).<sup>[49,124]</sup> Die MD-Simulation zeigt ausgehend von Struktur **g**, den Verlauf der strukturellen Umwandlungen in drei unterschiedlichen Pfaden. Im linken, senkrechten Pfad ist von **g** nach **e** der globale hydrophobe Kollaps des Peptids gezeigt, der zu einer *random-coil* Struktur führt. Im mittleren Pfad von **d** nach **a** nimmt das Peptid eine links-händige umwickelte Struktur ein und im oberen Pfad wird eine links-händige entwickelte Struktur eingenommen. Bei der Zerlegung der einzelnen Beiträge zur Wechselwirkungsenergie der rechtshändigen (nativen) und linkshändigen Topologie fällt auf, dass keine großen Unterschiede auftreten.<sup>[49]</sup>

Interessant wäre die Synthese eines Enantiomerenpaares von Lasso peptiden bzw. die Synthese von topologischen Isomeren durchzuführen, um dessen physikalische Eigenschaften und biologische Aktivität zu vergleichen. Dazu sind wiederum chemisch-synthetische Methoden notwendig, da auf dem natürlichen Biosyntheseweg keine enantiomeren Lasso peptide synthetisierbar sind bzw. noch keine Biosynthese von topologischen Isomere entdeckt/entwickelt wurde.



**Abbildung 1.23** Dreidimensionale Darstellung der REMD Trajektorie in den Eigenvektoren 2, 3 und 4 (evec2-4). Die farbigen Punkte entsprechen in **a)** dem  $\Delta$ -Wert der  $\beta$ -Faltblatt-ähnlichen Struktur des Microcins im oberen Teil des Peptids (*turn*), welcher sich durch die Addition der Abstände der  $\alpha$ -C-Atome im Faltblatt ergibt. Der mittlere Pfad, der von **g** über **d**, **c** und **b** nach **a** verläuft, führt zu einer links-händig-umwickelten, nicht-nativen Topologie, indem sich der N-Terminus gegen den Uhrzeigersinn um den C-Terminus wickelt. Im oberen Pfad von **g** über **h** nach **i** wird eine links-händige, ebenfalls nicht-native, entwickelte Struktur eingenommen. Im Plot **b)** verkörpern die farbigen Messpunkte den Glu<sup>8</sup>  $\Psi$  Winkel desselben Experiments. Die Abbildung wurde entnommen aus: A. L. Ferguson, S. Zhang, I. Dikiy, A. Z. Panagiotopoulos, P. G. Debenedetti, A. J. Link, *Biophysical Journal* **2010**, 99, 3056-3065 (Figure 4).<sup>[49]</sup>

### 1.3.1 Struktur, Aufbau und Stabilität

Wie bereits erwähnt ist die Topologie von Lassozeptiden bisher einzigartig und wird durch die Biosynthese von Actinobakterien oder Proteobakterien durchgeführt. Die Sequenzen von Lassozeptiden werden von unpolaren, hydrophoben Aminosäuren dominiert, wodurch die globale Ladung der Peptide neutral oder nur leicht geladen ist. Die absolute Konfiguration der Aminosäuren ist, mit Ausnahme von Cystein, *S*, die Topologie rechtshändig und der N-terminale Ring verläuft im Uhrzeigersinn. Die Stabilisierung der Lassostrukturen wird entweder nur durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (Klasse II), durch eine zusätzliche Disulfidbrücke (Klasse III) oder durch zwei zusätzliche Disulfidbrücken (Klasse I) erreicht. In der Klasse I befinden sich Peptide, in welchen das N-terminale Cys mit der Carboxylgruppe von Asp<sup>9</sup> über die Seitenkette kondensiert wurde und zusätzlich zwei Disulfidbrücken zwischen C<sup>1</sup>/C<sup>13</sup> und C<sup>7</sup>/C<sup>20</sup> enthalten sind. In dieser Klasse sind die Peptide Aborycin/RP71955, Siamycin I/II und Sviceucin enthalten. BI-32169 ist das einzige Lassozeptid der Klasse III, in der ein Lactamring zwischen Gly<sup>1</sup> und Asp<sup>9</sup> und eine Disulfidbrücke ausgehend vom Ring zwischen C<sup>6</sup> und C<sup>19</sup> gebildet wird, wodurch das C-terminale Ende an den Ring fixiert wird.<sup>[47,120–124,145]</sup> Sämtliche Peptide der Klasse I und III werden von Actinobakterien produziert und weisen N-terminal ein Gly auf. Durch Genomanalyse wird vermutet, dass ebenfalls Lassoptide mit Ser als N-terminale Aminosäure existieren könnten.<sup>[146]</sup>

Als mit Abstand größte Klasse der Lassoptide gilt Klasse II, in der zur Zeit 30 Peptide mit Lactamringen von sieben bis neun Aminosäuren vertreten sind, durch welche der C-terminale Teil eingefädelt ist. Die Position der Aminosäure, die für die Macrolactamisierung verwendet wird, ist entweder für Glu die Position 7, 8 oder 9 und für Asp die Position 8 und 9. Laut Genomanalysen wird Asp in der Position 7 und Glu in der Position 6 nicht für die Lactamisierung verwendet, dies wurde in den Synthesen der Xanthomone I und II bestätigt.<sup>[133,134]</sup> Eine Besonderheit der Lassoptide in Klasse II ist, dass sämtliche Strukturen ausschließlich durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden. Prominente Peptide dieser Klasse sind Microcin J25 (1992), Capistruin, Anantín (1991) und Lariatín, die sowohl von Actinobakterien wie auch Proteobakterien synthetisiert werden. Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht über die drei Klassen und deren Peptidsequenzen. Die Bestimmung der Topologie von Lassozeptiden, die nicht immer direkt und zweifelsfrei durchgeführt werden konnte, wie im Fall des Microcins J25, verlangt nach modernen und effektiven Analysemethoden, um neu-isolierte Lassoptide schnell zu analysieren. Zunächst gilt es vor allem die korrekte Primärstruktur und anschließend die richtige Topologie zu

**Tabelle 1.2** Übersicht der isolierten und charakterisierten Lasso peptide. In der Peptidsequenz wurden die Macrolactamring-bildenden Aminosäuren fett markiert. Zwischen Cysteinen gebildete Disulfidbrücken sind in rot und grün hervorgehoben. Peptide, die durch einen Stern markiert sind, werden von Actinobakterien, die ohne Stern durch Proteobakterien synthetisiert. Zusätzlich angegeben ist die Ringgröße des Macrolactamrings und die Länge des eingefädelten C-terminalen Endes.

Klasse I	Peptidsequenz	Ring (AS)	Schwanz (AS)
Aborycin *	CLGIGSCNDFAGCGYAVCFW <sup>[126,147]</sup>	9	12
Siamycin I*	CLGIGSCNDFAGCGYAIVCFW <sup>[148,149]</sup>	9	12
Siamycin II*	CLGVGSCNDFAGCGYAIVCFW <sup>[150]</sup>	9	12
Sviceucin*	CVWGGDCTDFLGCGTAWICV <sup>[151,152]</sup>	9	11
Klasse II	Peptidsequenz	Ring (AS)	Schwanz (AS)
Anantín*	GFIGWGNDFGHYSGDF <sup>[125,153]</sup>	8	9
Lariatín B*	GSQLVYREWVGHSNVIKPGP <sup>[154,155]</sup>	8	12
Propeptín*	GYPWWDYRDLFGGHTFISP <sup>[156,157]</sup>	9	10
RES-701-1*	GNWHGTAPDWFFNYYW <sup>[158,159]</sup>	9	7
RES-701-3*	GNWHGTSPDWFFNYYW <sup>[160]</sup>	9	7
SRO15-2005*	GYFVGSYKEYWSRRII <sup>[151]</sup>	9	7
Sungsanpin*	GFGSKPIDSFGLSWL <sup>[161]</sup>	8	7
Astexín 1	GLSQGVEPDIGQTYFEESRINQD <sup>[135,136]</sup>	9	14
Astexín 2	GLTQIQALDSVSGQFRDQLGLSAD <sup>[135,136]</sup>	9	15
Astexín 3	GPTPMVGLDSVSGQYWDQHAPLAD <sup>[135,136]</sup>	9	15
Burhizin	GGAGQYKEVEAGRWSRIDSDDE <sup>[133]</sup>	8	9
Caulonodin I	GDVLNAPEPGIGREPTG(LSRD) <sup>[133]</sup>	8	9(13)
Caulonodin II	GDVLFAPGPGVGRPPMG(LSED) <sup>[133]</sup>	8	9(13)
Caulonodin III	GQIYDHPEVGIGAYGCE(GLQR) <sup>[133]</sup>	8	9(13)
Capistruin	GTPGFQTPDARVISRFGFN <sup>[123]</sup>	9	10
Caulosegnín I	GAFVGQPEAVNPLGREIQG <sup>[132,162]</sup>	8	11
Caulosegnín II	GTLTPGLPEDFLPGHYMPG <sup>[132,162]</sup>	9	10
Caulosegnín III	GALVGLLLEDITVARYDPM <sup>[132,162]</sup>	9	10
Microcín J25	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG <sup>[129,130,163,164]</sup>	8	13
Rhodanodin	GVLPIGNEFMGHAATPG(ITE) <sup>[133]</sup>	8	9(12)
Rubrivinodin	GAPSLINSEDNPAFPQRV <sup>[133]</sup>	9	9
Sphingonodin I	GPGGITGDVGLGENNFG(LSDD) <sup>[133]</sup>	8	9(13)
Sphingonodin II	GMGSGSTDQNGQPKNLIGG(ISDD) <sup>[133]</sup>	8	11(15)
Sphingopyxín I	GIEPLGPVDEDQGEHYLFAGG(ITADD) <sup>[133]</sup>	9	12(17)
Sphingopyxín II	GEALIDQDVGGGRQQFLTG(IADD) <sup>[133]</sup>	8	11(15)

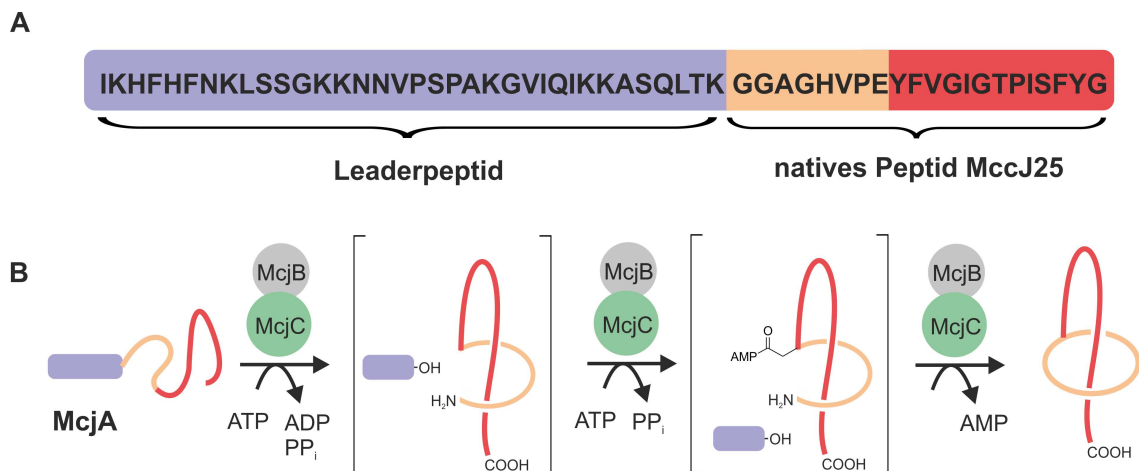
Syanodin I	GISGGTVDPAGQGLAG(ILDD) <sup>[133]</sup>	8	9(13)
Xanthomonin I	GGPLAGEEIGGFNVPG(ISEE) <sup>[134]</sup>	7	9(13)
Xanthomonin II	GGPLAGEEMGGITT(LGISQD) <sup>[134]</sup>	7	7(13)
Xanthomonin III	GGAGAGEVNGMSP(IAGISEE) <sup>[134]</sup>	7	6(13)
Zucinodin	GGIGGDFEDLNKPFVDV <sup>[133]</sup>	8	8
Klasse III	Peptidsequenz	Ring (AS)	Schwanz (AS)
BI-32169*	GLPWGCPSDIPGWNTPWAC <sup>[165,166]</sup>	9	10

bestimmen. Beides kann mit Hilfe von NMR-Spektroskopie in Kombination mit massenspektroskopischen Methoden erfolgen. Durch Massenspektrometrie lässt sich anhand der Fragmentationen und deren Muster ein Rückschluss auf bestimmte cyclische Strukturen wie Kopf-zu-Schwanz Macrocyclen, linear-verzweigte Cyclen oder Lasso peptide schließen.<sup>[56,123]</sup> Mittels NMR-Spektroskopie konnten bereits früh Lasso peptide analysiert und charakterisiert werden. Angewendet wurden vor allem 2D-NMR-Methoden, wie COSY, TOCSY, NOESY-Experimente sowie HSQC und HMBC-Experimente zur allgemeinen Strukturanalyse.<sup>[126,150,153,154,159]</sup> H/D-Austausch-Experimente und temperaturabhängige <sup>1</sup>H-NMR-Spektren liefern Informationen über die Stabilität von ausgebildeten Wasserstoffbrücken.<sup>[167]</sup> Wenn neben den Strukturanalysen der Peptide in Lösung zusätzlich ein Kristall erhalten wurde, kann mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur des Peptids in kristalliner Form gelöst werden, wodurch ein detailliertes Bild erhalten wird.<sup>[166,168]</sup> Aufgrund der schlechten Kristallisierbarkeit von Lasso peptiden ist die NMR-basierte Analytik die am meisten angewendete Methode zur Strukturaufklärung.

Die Unterscheidung zwischen richtig gefalteten Lasso peptiden und ausgefädelten Derivaten kann schnell mittels Carboxypeptidasen getroffen werden. Exoproteasen spalten Peptide/Proteine an deren endständigen Peptidbindungen. Bei Lasso peptiden kann aufgrund des N-terminalen Amids nur das C-terminale Ende angegriffen werden, das durch die besondere Topologie sterisch abgeschirmt und resistent gegenüber Hydrolyse ist. Viele Lasso peptide sind demnach gegen Carboxypeptidasen stabil, lineare oder linear-verzweigte, cyclische Peptide hingegen nicht.<sup>[132,135,143,144]</sup> Studien zur thermischen Belastbarkeit von Lasso peptiden geben ebenfalls Aufschluss über die korrekte Topologie.<sup>[28,123,134]</sup> Besonders stabile Lasso peptide wie Microcin J25 oder die Xanthomonine halten einige Stunden bei 95 °C ihre Topologie aufrecht.<sup>[28,134]</sup> Bei der Unterscheidung zwischen eingefädelt und ausgefädelt können ebenfalls MS/MS-Methoden (CID oder ECD) sowie Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie (IMS) angewendet werden.<sup>[56,169]</sup>

### 1.3.2 Biosynthese

Basierend auf ihrer anspruchsvollen Topologie konnte bisher keine chemische Synthese von Lassozeptiden durchgeführt werden.<sup>[47–49]</sup> Bislang beschränkt sich die Synthese dieser Peptidklasse auf die Biosynthese, die von Bakterien realisiert wird. Die erste in vitro Synthese von Microcin J25 ermöglichte eine grundlegende Analyse des Biosyntheseapparats.<sup>[137]</sup> DUQUESNE et al. konnten zeigen, dass die Lasso Topologie durch post-translationale Modifikation von einem 58-Aminosäure großen Precursor (*McjA*) durch die Enzyme *McjB* und *McjC*, die in dem MccJ25 Gencluster codiert sind, mit Hilfe von ATP und  $Mg^{2+}$  gebildet wird (siehe Abb. 1.24-A).<sup>[137]</sup>



**Abbildung 1.24 A)** Vollständige Primärsequenz des Precursor-Peptids von MccJ25. **B)** Biosynthese von Lassozeptiden am Beispiel von Microcin J25. Das Leaderpeptid wird katalytisch durch die Enzyme *McjB* und *McjC* unter Verbrauch von ATP hydrolytisch abgespalten und eine Lasso-Vorfaltung eingenommen. Durch die Aktivierung als AMP-Ester wird das Peptid mittels *McjC* enzymatisch cyclisiert. Abschließend findet der Export aus der Zelle statt. Die Abbildung basiert auf Abbildung 4.1 aus Y. Li, S. Zirah, S. Rebuffat in *Lasso Peptides: Bacterial Strategies to Make and Maintain Bioactive Entangled Scaffolds*, Springer, Heidelberg, **2015**, 82.<sup>[121]</sup>

Die Biosynthese verläuft analog zu anderen ribosomal synthetisierten und post-translational modifizierten Peptiden (RiPPs), indem ein lineares Precursor-Peptid synthetisiert wird, das post-synthetisch modifiziert und in seine endgültige Form gebracht wird.<sup>[109,110]</sup>

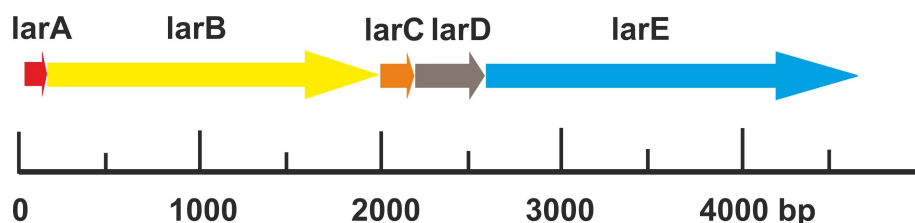
Im Fall des Microcins J25 besteht der Syntheseapparat aus den drei essentiellen Enzymen *McjA*, *McjB* und *McjC*. *McjA* stellt das N-terminale Leaderpeptid dar. Die Enzyme *McjB* und *McjC* sind für die Abspaltung des Kernpeptids und die Macrocyclisierung verantwortlich (siehe Abb. 1.24-B).<sup>[170]</sup> Zum Export des Lassozeptids aus der Zelle wird mit *McjD* ein weiteres Enzym benötigt, das in seiner Struktur den ABC-Transportern ähnelt.<sup>[142]</sup>

Durch Analyse der Proteinsequenz konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Teil des *McjBs* mit den eukaryotischen Transglutaminasen verwandt ist.<sup>[171]</sup> Diese Enzyme katalysieren durch eine Cys-His-Asp Triade und wirken als Proteasen. Dadurch ermöglichen



sie die  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysin Quervernetzungen in Proteinen. Der N-terminale Teil zeigt hingegen eine geringe Verwandtschaft mit Adenosin-Kinasen.<sup>[171]</sup> Das Enzym *McjC* ähnelt den Asparaginsynthetasen B, welche allgemein die ATP-abhängige Amidierung von Aspartat zu Asparagin katalysieren. Es wird angenommen, dass *McjC* für die Macrolactamisierung verantwortlich ist.<sup>[172]</sup> Wenn ein inaktives Derivat von *McjC* mit *McjB* inkubiert und die Biosynthese durchgeführt wird, führt dies zur Produktion von linearem Microcin J25, das bereits als lineares Zwischenprodukt ohne weitere Modifikation abgespalten werden kann.<sup>[139,173]</sup> Wenn andererseits eine inaktive Mutante von *McjB* und *McjC* verwendet wird, wird weder lineares noch natives Microcin J25 isoliert. Zusätzlich kann *McjC* lineares Microcin J25 ohne weitere Aktivierung von *McjB* in die native Form cyclisieren. Daran wird deutlich, dass *McjC* tatsächlich für die Macrolactamisierung und *McjB* als Cysteinprotease essentiell ist.<sup>[139]</sup>

Bis 2012 INOKOSHI et al. den Gencluster von Lariatrin aufgeklärten, galt die doppelte Enzymkatalyse des Microcins J25 lange Zeit als Grundmodell der Biosynthese von Lassozeptiden.<sup>[174]</sup> In diesem Gencluster befindet sich ein *McjC* Homolog sowie die Proteine *LarB1* und *LarB2*, die das Enzym *McjB* vertreten. *LarB2*, 147 Aminosäuren lang, stellt die katalytische Triade dar. *LarB1* besitzt hingegen keine Ähnlichkeit mit Peptidsequenzen, die bekannte Funktionen aufweisen (siehe Abb. 1.25).<sup>[174]</sup>



**Abbildung 1.25** Gencluster der Biosynthese von Lariatrin. Der lineare Precursor *larA* wird von *larB*, *larC* und *larD* verarbeitet und das entstehende native Lariatrin wird von *larE* abschließend exportiert. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus: J. Inokoshi, M. Matsuhama, M. Miyake, H. Ikeda, H. Tomoda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 95, 451-460 (Figure 3).<sup>[174]</sup>

N-terminale Leaderpeptide sind in nahezu allen RiPPs in bestimmten Längen und Sequenzabfolgen zu finden,<sup>[108]</sup> außer in der Klasse der Bottromycine, die C-terminal ein Followerpeptid aufweisen.<sup>[175–177]</sup> Das Konzept der Leaderpeptide als funktionale, intramolekulare Chaperone, die im Fall des Microcins J25 die Vorfaltung des Lassozeptids begünstigen, wurde von TSAI et al. vorgestellt.<sup>[178]</sup> Bestätigt werden konnte diese These durch Experimente mit Kernpeptiden ohne Leaderpeptide, die in Lösung durch Click-Chemie cyclisiert wurden und nicht zum nativen Lassozeptid führten. Mittels Molekularsimulationen konnte gezeigt werden, dass in Lösung die rechtshändigen nativen Lassostrukturen nicht von Leaderpeptid-losen Kernpeptiden eingenommen werden, sondern nicht-native linkshändige



Konformationen beobachtet werden.<sup>[49]</sup> Dieses lässt darauf schließen, dass die Enzyme *McjB* und *McjC* sowie das Leaderpeptid entscheidenden Einfluss auf die korrekte Faltung und rechtshändige Topologie der Lassoptide haben. Durch Mutagenese-Experimente konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein großer Teil des Leaderpeptids nicht essentiell für die Biosynthese von Microcin J25 ist, aber eine katalytische Wirkung besitzt. Wird das Leaderpeptid auf die letzten acht Aminosäuren in Richtung C-terminales Ende beschränkt, findet die Biosynthese in einer 256-fachen Reduktion weiterhin statt.<sup>[179]</sup>

Die Ausbeute von in-vitro Biosynthesen der Lassoptide ist in vielen Fällen gering, wodurch die weitere Erforschung dieser Peptidklasse gehemmt wird. Über die Regulation der Produktion von Lassoptiden ist bisher wenig bekannt. Erste Einsichten wurden erneut für die Synthese von Microcin J25 erhalten.<sup>[180]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Darstellung von Microcin J25 durch Eisenmangel induziert wird und während der stationären Phasen in Minimalmedien von LB und M63 stark ansteigt.<sup>[181]</sup> Minimalmedien enthalten lediglich die essentiellen Nährstoffe, die für das Wachstum des entsprechenden Wirkstoffs nötig sind.

### 1.3.3 Biologische Aktivität

Eine große Anzahl der Lassoptide weisen vielseitige biologische Aktivitäten als Rezeptor-Antagonisten oder Enzym-Inhibitoren auf und können zusätzlich antivirale und antimikrobielle Eigenschaften besitzen.<sup>[182]</sup> Tabelle 1.3 gibt eine Übersicht über entsprechende Lassoptide und deren biologische Aktivität. Es ist bekannt, dass die Lassoptide Anantin, Sungsanpin, Caulosegnine und Xanthomone bisher keine biologische Aktivität aufweisen.<sup>[125,132,134,161]</sup> Dabei ist noch zu klären, ob diese Peptide prinzipiell keine Aktivität besitzen, wodurch die biologische Aktivität der Lassoptide zu einer sekundären Funktion wird, oder ob die entsprechenden Organismen noch nicht identifiziert werden konnten.<sup>[182]</sup> Am interessantesten für diese Arbeit sind die antimikrobiellen Eigenschaften der Lassoptide, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird. Die Bandbreite der antimikrobiellen Lassoptide hängt stark vom produzierenden Bakterium ab.<sup>[182]</sup> Peptide, die von Actinobakterien synthetisiert werden, zeigen bevorzugt eine Aktivität gegen *gram*-positive Bakterien. Von Proteobakterien produzierte Lassoptide zeigen eine biologische Aktivität gegen Bakterien, die nahe Verwandte des produzierenden Bakterienstrangs sind.

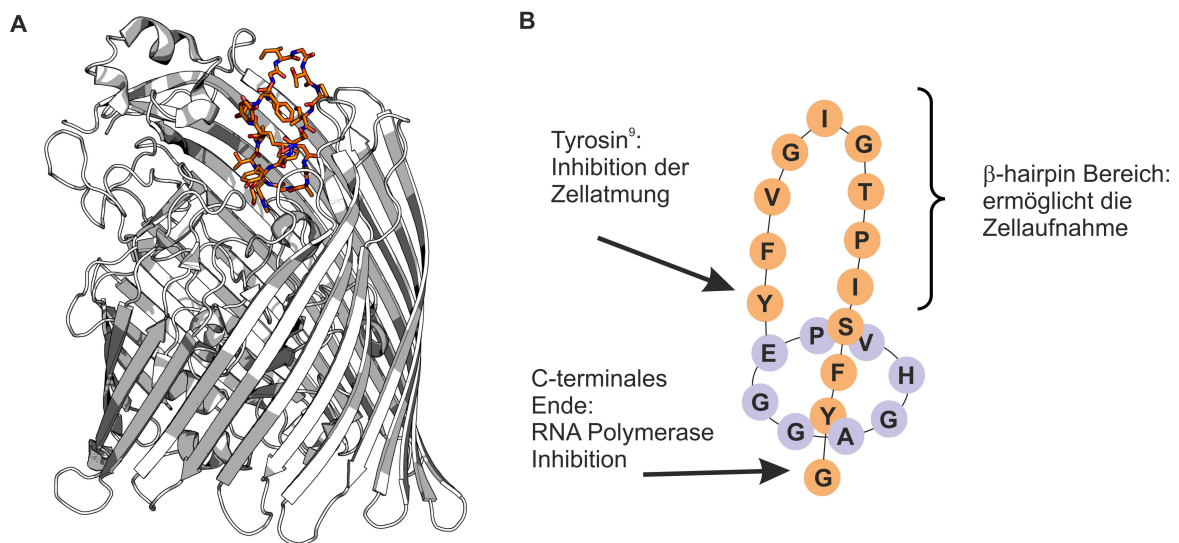
**Tabelle 1.3** Übersicht von ausgewählten Lassozeptiden und deren biologischen Aktivitäten. Mit \* markierte Peptide werden von Actinobakterien, sämtliche andere Peptide werden von Proteobakterien synthetisiert.<sup>[182]</sup>

Lassozeptid	Klasse	Biologische Aktivität
Siamycin*	I	anti-HIV/antibiotisch/MLKK-Inhibitor <sup>[148,150,183,184]</sup>
Aborycin*	I	anti-HIV/antibiotisch <sup>[147,185]</sup>
Sviceucin*	I	antibiotisch <sup>[186]</sup>
Anantin*	II	atrial natriuretisches Peptid-Antagonist <sup>[125]</sup>
Propeptin*	II	Prolyl oligopeptidase-Inhibitor/antibiotisch <sup>[187]</sup>
Lariatatin*	II	antimikrobiell <sup>[155]</sup>
BI-32169*	III	Glukagonrezeptor-Antagonist <sup>[165,188]</sup>
RES-701-1/3	II	Endothelin B Rezeptor-Antagonist <sup>[189,190]</sup>
Microcin J25	II	antibiotisch/RNA Polymerase-Inhibitor <sup>[129,130,191,192]</sup>
Capistruin	II	antibiotisch/RNA Polymerase-Inhibitor <sup>[123,138]</sup>
Astexin	II	antibiotisch <sup>[136]</sup>

Propeptin und Aborycin bilden eine Ausnahme, beide Peptide weisen sowohl eine biologische Aktivität gegen *gram*-positive als auch gegen *gram*-negative Bakterien auf.<sup>[147,187]</sup>

Die biologische Aktivität und der Wirkmechanismus des Microcins J25 ist innerhalb der Lassozeptide am ergiebigsten untersucht worden, da dieses Peptid, verglichen mit den anderen Lassozeptiden, die größte biologische Aktivität aufweist.<sup>[193]</sup> Die antibakterielle Aktivität kann in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird das Peptid vom entsprechenden Bakterium aufgenommen, wobei das an der äußeren Membran bindende Eisen-Siderophor-Rezeptorprotein *FhuA* involviert ist.<sup>[163,193,194]</sup> Microcin J25 bindet dabei an *FhuA* und wird ähnlich einem trojanischen Pferd in die Zelle geschleust.<sup>[168]</sup> *FhuA* ist ein 79 kDa großes  $\beta$ -Barrel-Protein, bestehend aus 22 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (siehe Abb. 1.26-A).<sup>[195]</sup> Je größer die Konzentration an vorhandenem *FhuA*, desto effektiver wird die Microcin J25 Aufnahme in die Zelle. Für die Erkennung und Bindung ist besonders der  $\beta$ -*hairpin* Bereich des Microcins J25, im speziellen Ile<sup>13</sup>, von Bedeutung. Durch Mutation dieser Aminosäure oder durch post-translational Veränderung ist keine Aufnahme mehr möglich. Die Bindung wird zusätzlich durch zwei Wasserstoffbrücken ausgehend von Ala<sup>3</sup> und His<sup>5</sup> stabilisiert.<sup>[196]</sup> Nach Erkennung und Bindung des Lassozeptids erfordert der *FhuA*-basierte Transport Energie, die durch den elektrochemischen Protonengradienten bereitgestellt und durch den *TonB/ExbB/ExbD* Komplex, der in der inneren Membran lokalisiert ist, vermittelt wird.<sup>[193,197,198]</sup>

Um gänzlich in die Zelle zu gelangen muss nach der äußeren Membran die innere Membran überwunden werden. Dies gelingt mit dem inneren Transmembran-Transportprotein *SbmA*.<sup>[163,199,200]</sup>



**Abbildung 1.26 A)** Struktur des *FhuA* als Komplex mit Microcin J25 (orange). MccJ25 bindet an die extrazelluläre Tasche des Außenmembran-Ferrichrom-Rezeptors und nimmt dabei die Bindungsstelle des Ferrichroms ein. Gut zu erkennen ist die  $\beta$ -Barrel-Struktur des *FhuA* in grau. **B)** Übersicht der Struktur-Aktivitätsbeziehungen des Microcins J25.

Nach Erreichen des Cytoplasmas der Zelle weist Microcin J25 einen dualen und voneinander unabhängigen Wirkungsmechanismus auf, der einerseits die RNA Polymerase und andererseits die Zellatmungskette inhibiert.<sup>[198,201,202]</sup> Zur Inhibition der RNA Polymerase wird der sekundäre Polymerasekanal versperrt, wodurch die Aufnahme der Nukleosidtriphosphate (NTP) gehindert wird. Zusätzlich kann eine Bindung an die RNA Polymerase erfolgen.<sup>[201]</sup> Beide Wirkungsmechanismen können bestimmten Strukturabschnitten des Microcins J25 zugeordnet werden. MORENO et al. konnten zeigen, dass der C-terminale Teil des Microcins in der RNA-Polymerase-Inhibition involviert ist, aber nicht die Zellatmung inhibiert.<sup>[202]</sup> Die Inhibition der Zellatmung erfolgt maßgeblich durch Tyr<sup>9</sup>. Durch Mutation dieser Aminosäure mit Phenylalanin verliert das Peptid die Fähigkeit Superoxide zu produzieren und den Sauerstoffverbrauch zu inhibieren.<sup>[203]</sup> Der bereits beschriebene  $\beta$ -hairpin Bereich dient lediglich zur Aufnahme und zeigt keine biologische Aktivität (siehe Abb. 1.26-B).<sup>[196]</sup> Aufgrund der räumlichen Ausrichtung wurde der exponierte turn Gly<sup>12</sup>Ile<sup>13</sup>Gly<sup>14</sup> von KNAPPE et al. durch das Integrin-bindende Motiv RGD mittels Mutagenese substituiert und dessen Affinität erfolgreich bezüglich Integrinen in Inhibitionsassays untersucht.<sup>[144]</sup> Als therapeutische Targets und wegen ihrer Rolle im Tumorwachstum wächst das Interesse an den RGD-bindenden Integrinen  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  stetig.<sup>[144,204]</sup>

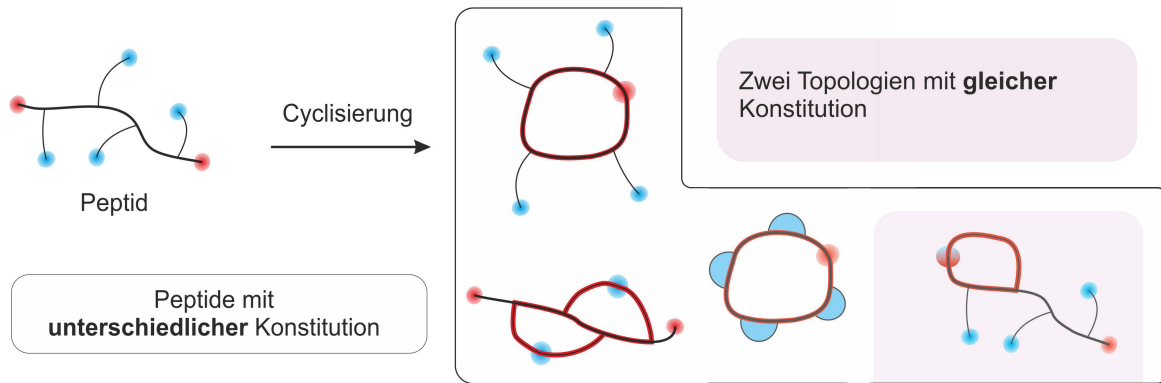
## 2 Aufgabenstellung

Die Topologie eines Peptids, welche die räumliche Anordnung einer entsprechenden Peptidkette darstellt, wird primär durch dessen Aminosäuresequenz festgelegt. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter, ergeben in der Summe die Tertiärstruktur eines Peptids, die in Proteinen die Bildung von Quartärstrukturen bestimmt. Die Faltung eines Peptids/Proteins in die native Topologie erfolgt meist spontan und unter physiologischen Bedingungen. Allerdings gibt es Peptide, die nur mit Hilfe von zusätzlichen Enzymen bzw. Chaperonen in die endgültige räumliche Struktur gebracht werden können. In diese Kategorie fällt die Gruppe der Lasso peptide, mit Microcin J25 oder Capistrin als prominente Beispiele. Die chemische Synthese solcher topologisch einzigartigen Strukturen konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden.

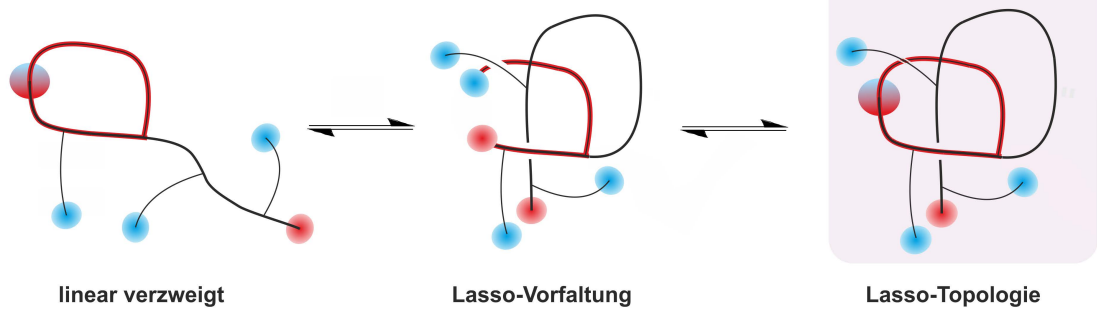
Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von reversiblen Cyclisierungsmethoden für Peptide, welche es ermöglichen sollten, die einzigartige Topologie von Lasso peptiden und weitere Topologien durch chemisch-synthetische Methoden darzustellen und NMR-spektroskopisch zu analysieren. Konkret sollten folgende Aspekte untersucht werden:

- Die Synthese von C-terminalen Peptidaldehyden sollte im Rahmen des 18-gliedrigen, cyclischen Hexapeptids Segetalin A, durchgeführt, ein Protokoll zur pH-Wert abhängigen Cyclisierung im wässrigen Milieu erstellt sowie die Cyclisierungstendenz analysiert werden.
- Neben den gebildeten Macrocyclen sollte die Bildung von Polymeren im chemischen Gleichgewicht untersucht und quantifiziert werden.
- Ein Syntheseweg für Fmoc-geschützte und in der Festphasenpeptidsynthese einsetzbare, seitenkettenfunktionalisierte Aldehyde der Glutaminsäure und Asparaginsäure sollte im Multigramm-Maßstab erarbeitet werden.
- Lineare Lasso peptide des Microcins J25 und deren Derivate sollten post-synthetisch modifiziert werden, sodass chemoselektiv eine Aldehydfunktion in der Seitenkette der Glutaminsäure erhalten wird.
- Die Cyclisierungstendenz der synthetisierten Seitenketten-Peptidaldehyde sollte unter physiologischen Bedingungen analysiert und die Topologie der entstehenden Macrocyclen charakterisiert werden.
- Durch zwei regioselektiv gebildete Disulfidbrücken sollten lineare Vorläuferpeptide des Lasso peptids Microcin J25 cyclisiert und deren Topologie untersucht werden.
- Die biologische Aktivität gegen *gram*-negative Bakterien der chemisch-synthetisch hergestellten Peptide sollte unter geeigneten Bedingungen untersucht werden.

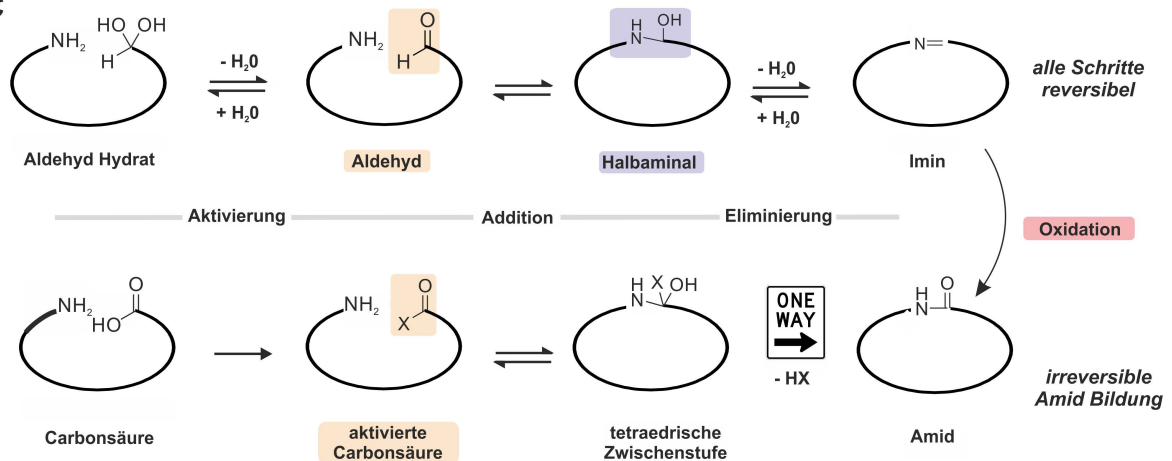
A



B



C



**Abbildung 2.1** Macrocyclisierung von Peptiden – Konstitution vs. Topologie. **A)** Die unselektive intramolekulare Kondensation von Aminen und Carbonsäuren ergibt eine Vielzahl an cyclischen Peptiden mit unterschiedlichen Konstitutionen. In rot dargestellt sind Rückgrat-Cyclisierungen, in blau Cyclisierungen über die Seitenketten. Zusätzlich zu den Konstitutionsisomeren können cyclische Peptide mit gleicher Konstitution aber unterschiedlicher Topologie, in diesem Fall die Lasso-Topologie, auftreten. Ziel dieser Arbeit ist die chemische Synthese dieser besonderen und topologisch anspruchsvollen Lasso-peptide. **B)** Durch die reversible Reaktionsführung können die unterschiedlichen Topologien und die benötigte Vorfaltung zum Lasso-peptid analysiert werden. **C)** Die Substitution einer Amid-Bindung gegen ein Imin transformiert die irreversible Cyclisierung in einen vollständig reversiblen, pH-Wert abhängigen Prozess, der NMR-spektroskopisch untersucht werden kann. Die gezeigte Methode ist der zentrale Bestandteil dieser Arbeit. Die abschließende Oxidation zum entsprechenden nativen Amid ist ein irreversibler Prozess.

Als reversible Cyclisierungsmethode sollte primär die isostere Substitution eines Amids gegen ein Imin realisiert werden. Dies kann ermöglicht werden, indem die C-terminale oder die in der Seitenkette (Glu, Asp) vorhandene Carboxylgruppe in eine Aldehydgruppe überführt werden. Es sollten Synthesewege für eine geeignete post-synthetische Transformation der Carbonsäure in einen Aldehyd oder für entsprechende Aldehyd-Aminosäurebausteine, die in der Festphasenpeptidsynthese verwendet werden können, entwickelt werden. Von besonderem Interesse war in erster Linie die Synthese der Seitenketten-funktionalisierten Aldehyde der Aminosäuren Glu und Asp, die eine zentrale Rolle in dieser Arbeit darstellten. Nach erfolgreicher Synthese der Aminosäurederivate und deren Einbau in native Peptidsequenzen, sollte die Cyclisierungstendenz der synthetischen Peptide unter physiologischen Bedingungen mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Durch die reversible Gestaltung des Cyclisierungsprozesses sollte als logische Sequenz die Bildung von Polymeren, die im Gleichgewicht ebenfalls entstehen können, neben der Bildung der Macrocyclen analysiert und quantifiziert werden.

Die reversible Bildung von einer oder mehreren Disulfidbrücken innerhalb eines Peptids sollte ebenfalls zur selektiven Synthese von Lasso-Topologien eingesetzt und zusätzlich die Vor- und Nachteile beider Methoden analysiert und gegenübergestellt werden. Die organisch-synthetisch hergestellten Peptide sollten abschließend auf ihre biologische Aktivität gegenüber *gram*-negativen Bakterien untersucht werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

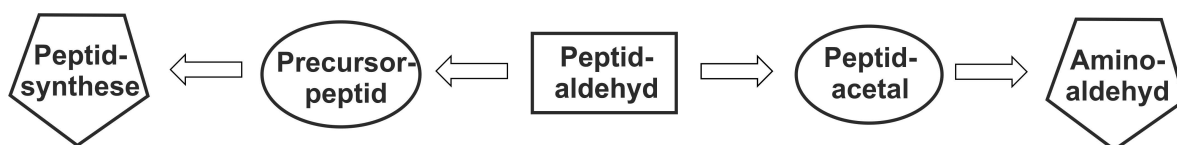
#### 3.1 Synthese und Cyclisierung von C-terminalen Peptidaldehyden

Peptidaldehyde weisen durch die zusätzliche Carbonyl-Funktion vielfältige Eigenschaften und Anwendungen auf.<sup>[205]</sup> Vor allem reversible sowie irreversible kovalente Ligationen können mittels Aldehyden durchgeführt werden.<sup>[206,207]</sup> Oxim- und Hydrazon-Ligationen wurden ebenfalls eingehend untersucht und charakterisiert.<sup>[208,209]</sup> Zusätzlich sind C-terminale Peptidaldehyde potente Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen wie Plasmin, Trypsin oder Papain und können Aspartylproteasen hemmen.<sup>[210–212]</sup> Diese Eigenschaften basieren nicht auf der Carbonyl-Funktion, sondern entstehen durch die Hydrat-Bildung in wässrigem Milieu, die den Übergangszustand des Substrats während der Hydrolyse imitiert.

Die vielfältigen Eigenschaften dieser Peptidklasse haben aufgrund ihrer hohen Reaktivität den Nachteil der chemischen Instabilität. Die höhere Acidität des  $\alpha$ -Wasserstoffatoms von Aldehyden ( $pK_s \approx 18$ ) gegenüber Amiden ( $pK_s \approx 30$ ) führt bereits im wässrigen Milieu unausweichlich zu einer Epimerisierung, die anhand des Aldehyd-Signals direkt im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ermittelt werden kann.<sup>[213–215]</sup>

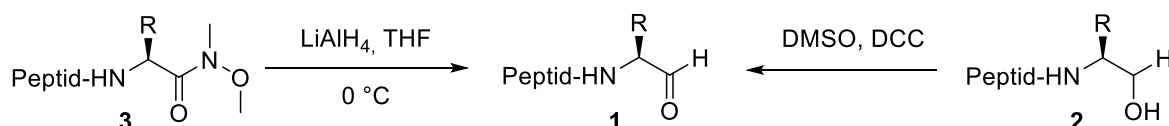
##### 3.1.1 Synthesestrategie von C-terminalen Peptidaldehyden

Aufgrund der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten ist das Interesse an synthetischen und leicht zugänglichen Peptidaldehyden stark angestiegen. Die Synthesestrategie kann in zwei unterschiedliche Routen eingeteilt werden. Im ersten Syntheseweg wird das Peptid zunächst nach Standardmethoden synthetisiert und abschließend in einer chemoselektiven Reaktion der Aldehyd gebildet. Die zweite Möglichkeit besteht darin, den Aminosäurealdehyd bereits vorher als Monomer zu synthetisieren und geschützt in die Peptidsynthese einzubringen. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Freisetzung des Aldehyds. Beide Methoden können sowohl an der festen Phase als auch in Lösung durchgeführt werden (Abb. 3.1).



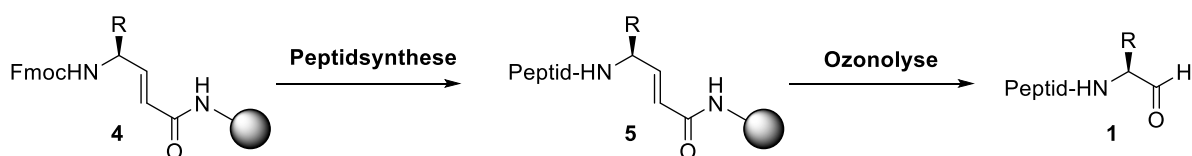
**Abbildung 3.1** Unterschiedliche Synthesestrategien von Peptidaldehyden. Der linke Syntheseweg beginnt mit der standardisierten Peptidsynthese und liefert ein Precursor-Peptid, das in einer chemoselektiven Reaktion in den entsprechenden Peptidaldehyd transformiert wird. Die rechte Syntheseroute beschreibt die Synthese eines geschützten Aminosäurealdehyds, der direkt in das Peptid eingebaut und post-synthetisch freigesetzt wird.

Die Einführung von Peptidaldehyden **1** nach der Peptidsynthese kann nur durch geeignete Oxidations- oder Reduktionsreaktionen erfolgen. In einer häufig durchgeführten Methode werden C-terminale Peptidester mittels  $\text{NaBH}_4$  zum Alkohol **2** reduziert und im Rahmen einer PFITZNER-MOFFATT-Oxidation zum Aldehyd **1** oxidiert (Schema 3.1).<sup>[216]</sup> In einer weiteren Syntheseroute werden Aminoalkohole an die feste Phase gebunden, nach erfolgreicher Elongation vom Harz abgespalten und direkt mittels DESS-MARTIN-PERIODINAN oxidiert. Zur Aufreinigung wird der Peptidaldehyd chemoselektiv an ein polymergebundenes Threonin kondensiert und Edukte sowie Reagenzien gewaschen. Der reine Peptidaldehyd wird abschließend unter sauren Bedingungen erneut abgespalten.<sup>[217]</sup> Reduktiv werden Peptidaldehyde ausgehend von Weinreb Amiden **3** <sup>[218,219]</sup>, Morpholin Amiden<sup>[220]</sup>, Estern<sup>[221–224]</sup> und Thiazolidinen<sup>[225]</sup> gebildet. In den meisten dieser Fälle wird eine selektive Reduktion mittels Lithiumaluminiumhydrid-Derivaten durchgeführt, die nach wässriger Aufarbeitung den Peptidaldehyd freisetzen (Schema 3.1). Im Fall der Thiazolidine wird die Hydrolyse mittels  $\text{CuO} \cdot \text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt.<sup>[225]</sup>



**Schema 3.1** Reduktiv und oxidativ vermittelte Synthese von Peptidaldehyden **1**. Die Syntheseroute, in welcher der primäre Alkohol **2** mittels DMSO, DCC; IBX oder  $\text{SO}_3$ , DMSO und Pyridin zum Aldehyd oxidiert wird ist rechts dargestellt. Links gezeigt ist die Syntheseroute, die ausgehend von Weinreb Amiden **3**, Estern oder Thiazolidinen in einer Reduktion den Aldehyd bildet. Die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren werden mit R abgekürzt.

Die alternative Syntheseroute von Peptidaldehyden über  $\alpha$ -Aminoaldehyde, die bereits als Monomere geschützt werden, ist ebenfalls eine elegante und besonders für die Synthese in Lösung geeignete Methode. Etabliert haben sich Aldehyd-Schutzgruppen wie Semicarbazone,<sup>[211,226,227]</sup> Oxazolidine,<sup>[228]</sup> *N*-Methylthiazolidine<sup>[229]</sup> oder klassische Acetale.<sup>[230]</sup> Neben der direkten Synthese mittels Oxidation, Reduktion oder Schützung der Aldehydgruppe kann die Aldehyd-Funktion als latente funktionelle Gruppe in Peptiden enthalten sein, die post-synthetisch durch chemoselektive Reaktionen freigesetzt werden kann. Olefin-gebundene Peptide **5**, die über Ozonolyse oder LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation in den entsprechenden Aldehyd **1** transformiert werden können, sind hierbei insbesondere zu nennen (siehe Schema 3.2).<sup>[231–233]</sup>

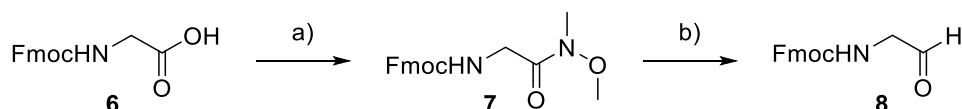


**Schema 3.2** Synthese von Peptidaldehyden **1** mittels Ozonolyse ausgehend von Olefin-gebundenen Peptiden **5**. Die Anbindung des Aminoaldehyds an das Harz als Olefin **4** erfolgt in einer Wittig-Reaktion mit dem entsprechenden Phosphorylid.<sup>[232]</sup>



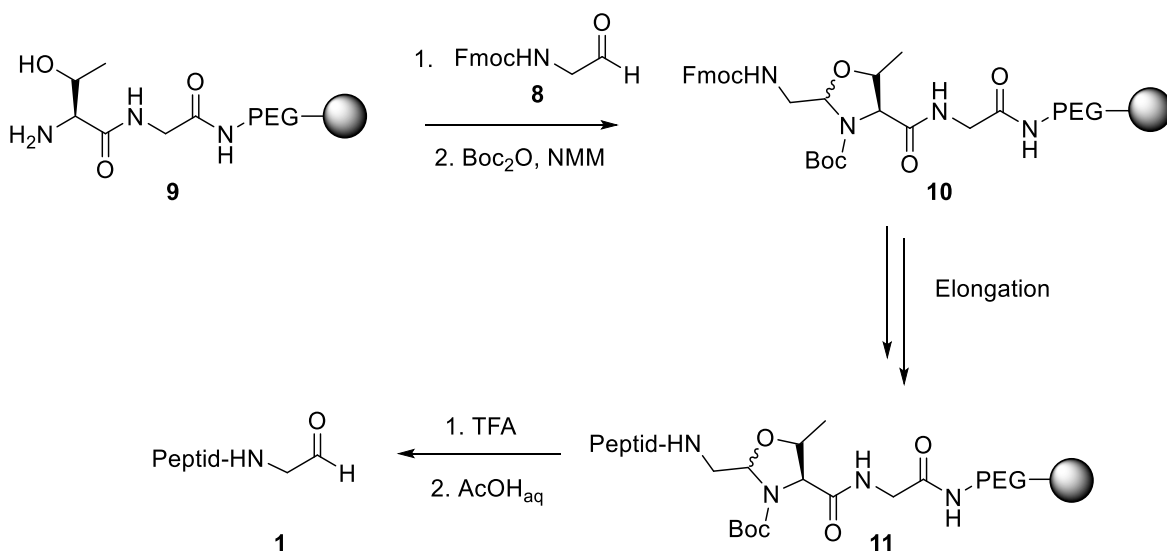
### 3.1.2 Festphasensynthese von C-terminalen Peptidaldehyden

In dieser Arbeit erfolgte die Synthese von C-terminalen Peptidaldehyden **1** ausschließlich mittels Festphasensynthese. Es wurden zwei Synthesewege gewählt, die auf einer identischen Methode basieren. Für die Synthese, der für die Peptidsynthese benötigten Aminoaldehyde **8**, wurden Weinreb Amide **7** synthetisiert, die in der nächsten Stufe mittels selektiver LAH-Reduktion zum Aldehyd **6** umgesetzt wurden (siehe Schema 3.3).<sup>[234]</sup> Diese Methode konnte erfolgreich an Fmoc- und Boc-geschützten Aminosäuren durchgeführt werden und liefert den Aldehyd **8** je nach Seitenkettenrest in Ausbeuten zwischen 50% bis 80%.



**Schema 3.3** Synthese von Fmoc-geschützten Aminoaldehyden **8** mittels selektiver Reduktion von Weinreb Amid **7** gezeigt am Beispiel von Fmoc-Glycin-OH (**6**). Schritt a) HBTU (2.6 eq), HOBt (1.1 eq), *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (2.6 eq), DIPEA (2.6 eq) in DMF, 4h, RT. Schritt b) LiAlH<sub>4</sub> (2.5 eq) in THF<sub>abs.</sub>, 20 min, 0 °C.

Zu Beginn der Arbeit wurde ein NovaSyn®TG-Harz **9** verwendet, das über ein Thr-Gly Dipeptid den entsprechenden Aldehyd **8** als Oxazolidin kovalent bindet. Nach Boc-Schützung des Oxazolidins **10** erfolgte die Synthese der Peptide mittels Fmoc-Schutzgruppen-Strategie in Richtung des N-Terminus.<sup>[228]</sup> Dazu wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin (20%ig in DMF) abgespalten, das Harz gewaschen und mit Kupplungsreagenzien wie HBTU oder DIC (2.5 eq) sowie Additiven wie HOBt oder Oxyma (2.5 eq) die Kupplung durchgeführt (siehe Schema 3.4).



**Schema 3.4** Synthese von C-terminalen Peptidaldehyden **1** an der festen Phase mittels des NovaSyn®TG-Harz **9**. Die kovalente Bindung an das Harz erfolgt über ein Oxazolidin **10**, das nach vollständiger Synthese und Entschützung mit wässriger Essigsäure in MeOH/DCM unter milden Bedingungen hydrolysiert und der Peptidaldehyd **1** erhalten wird.

Abhängig von der Länge der Peptidsequenz wurden die Schritte entsprechend oft wiederholt. Nach Synthese der gesamten Peptidkette wurden die Peptide **11**, die ausschließlich Boc- und *t*Bu-Schutzgruppen aufweisen, an der festen Phase vollständig mit wasserfreier Trifluoressigsäure entschützt und mit AcOH/H<sub>2</sub>O/DCM/MeOH (10:5:63:22) von der festen Phase abgespalten. Nach der standardisierten Aufarbeitung wurden die Peptidaldehyde **1** erhalten. Peptide, die zusätzlich Trt- und Pbf-Schutzgruppen tragen, wurden mit einem Abspaltcocktail aus TFA/Anisol/Thioanisol/H<sub>2</sub>O (85:5:5:5) abgespalten, um reaktive Carbenium-Ionen abzufangen.<sup>[235]</sup> Der Abspaltcocktail, der als Standard in der Festphasenpeptidsynthese verwendet wird und aus TFA/Wasser/Phenol/ TIPS (88:5:5:2) besteht, würde zur Reduktion des Aldehyds führen und konnte deshalb nicht verwendet werden.<sup>[235]</sup>

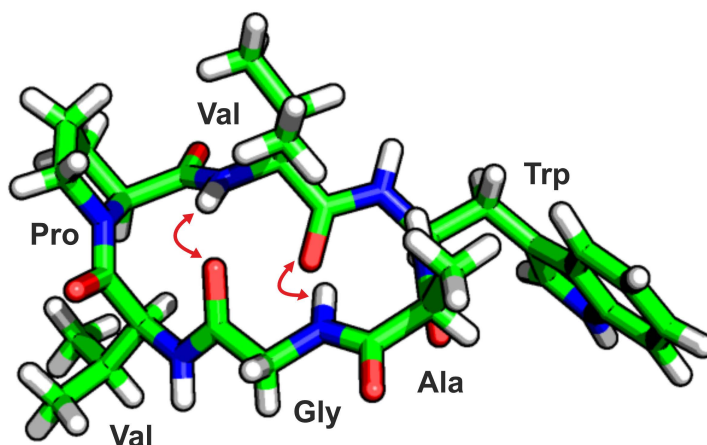
Im Laufe dieser Arbeit wurde die bestehende Methode dahingehend verändert, dass anstatt des NovaSyn®TG-Harzes ein unbeladenes 2-CTC-Harz verwendet wurde, das ebenfalls in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt wird und erheblich kostengünstiger ist. Zusätzlich kann auf jahrelange Erfahrung mit diesem Harz seitens der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Das Dipeptid Thr-Gly wurde manuell durch Beladen des Harzes mit Glycin und anschließender Kupplung von Threonin an die feste Phase gebunden. Die nachfolgende Kondensation und Peptidsynthese erfolgten analog. Die Abspaltung der Peptidaldehyde wurde ausschließlich mit TFA/Anisol/Thioanisol/H<sub>2</sub>O (85:5:5:5) durchgeführt, da eine Mischung aus AcOH/DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O zu polar ist und das Harz nicht gequellt werden kann.

Neben dem Dipeptid Thr-Gly wurde ebenfalls ein Ser-Gly Dipeptid synthetisiert und auf die Oxazolidin-Bildung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion erheblich langsamer und nicht quantitativ stattfindet. Nachteilig an dieser Methode ist, dass eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC zwingend durchgeführt werden muss, da ansonsten das als Linker genutzte Dipeptid nicht abtrennbar ist.

Aufgrund der schnellen Racemisierung von  $\alpha$ -Aminoaldehyden wurden hauptsächlich Peptidaldehyde mit Glycin am C-terminalen Ende synthetisiert. Dieses hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Epimere bei der Cyclisierung und Analytik entstehen.<sup>[213,214]</sup> Durch die hohe Acidität erfolgt während der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ein rascher H/D-Austausch, wodurch die  $\alpha$ -Protonen des Aminoaldehyds nicht mehr zu detektieren sind.

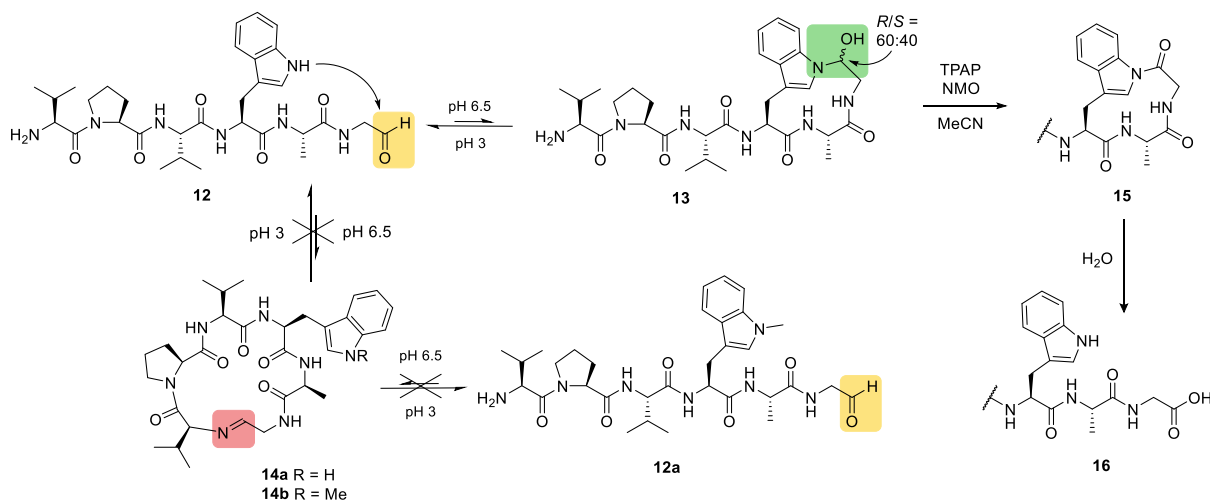
### 3.1.3 Synthese und Cyclisierung des Segetalin A Aldehyds

Cyclische Peptide repräsentieren eine stark wachsende und wichtige Peptidklasse, die interessante und besonders für die medizinische Chemie wichtige biologische Funktionen aufweist. JEAN-MARIE LEHN hat das Konzept der *dynamic libraries* für achirale Dialdehyde und Diamine<sup>[236,237]</sup> sowie für Aminoaldehyde<sup>[238]</sup> etabliert. Die Umkehr dieser Idee ist die Insertion einer Iminbindung in einen macrocyclischen Ring, der ursprünglich keine einfach hydrolysierbare Bindung enthält. Auf die Macrocyclisierung von Peptidaldehyden angewendet, konnte, in den bisher untersuchten Beispielen der Nostocyclopeptide<sup>[239,240]</sup> und des Tyrocidin-Aldehyds<sup>[241]</sup> unter geeigneten pH-Bedingungen mit erstaunlicher Selektivität die bevorzugte Bildung der macrocyclischen Ringe beobachtet werden. Neben Cyclosporin, Tyrocidin oder Vasopressin gibt es die Gruppe der cyclischen Hexapeptide, die neben ihren biologischen Aktivitäten auch strukturell ausgiebig untersucht wurden.<sup>[242–247]</sup> Cyclische Hexapeptide gehören aufgrund ihrer biologischen Bedeutung, aber auch als Modellsysteme einer minimalen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur, zu den am intensivsten untersuchten makrocyclischen Ringen.<sup>[248]</sup> Segetalin A ist ein solches cyclisches Hexapeptid mit der Sequenz cyclo[-Val-Pro-Val-Trp-Ala-Gly], das aus Samen von *Vaccaria segetalis*, einer Pflanzengattung der Kuhnelke, 1994 von MORITA et al. isoliert wurde.<sup>[249]</sup> Die Samen der Kuhnelke weisen eine starke Östrogen-ähnliche Wirkung auf und werden genutzt, um den Blutfluss zu aktivieren, die Milch-Sekretion zu unterstützen und Amenorrhö sowie Brustinfektionen zu behandeln.<sup>[246,249]</sup> Die Struktur von Segetalin A wurde kristallographisch sowie in Lösung mittels NMR-Spektroskopie untersucht und es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Strukturen im Festkörper und in Lösung ausgebildet werden.<sup>[246]</sup> Die Struktur des kristallinen Segetalin A ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



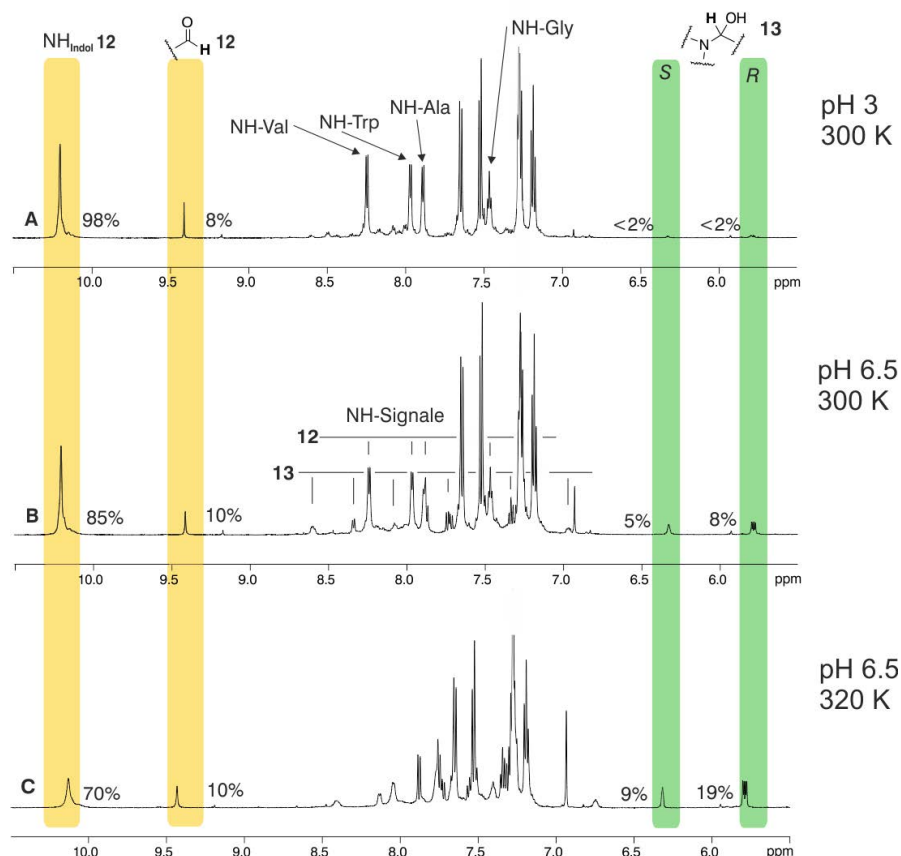
**Abbildung 3.2** Darstellung der Kristallstruktur von Segetalin A mittels HyperChem®.<sup>[246]</sup> Wasserstoffbrücken, welche die Struktur stabilisieren, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Gut zu erkennen ist die *cis*-Amidbindung des Prolins innerhalb des  $\beta$ -VI-turns. Zusätzlich wird das Hexapeptid durch einen  $\beta$ -I-turn charakterisiert. In Lösung findet ein Wechsel des  $\beta$ -I-turn zu einem  $\beta$ -II-turn statt.

Im festen Zustand wird das Peptid durch zwei  $\beta$ -turns charakterisiert, einen  $\beta$ -I-turn (Trp<sup>4</sup> und Ala<sup>5</sup>) und einen  $\beta$ -VI-turn (Val<sup>1</sup> und Pro<sup>2</sup>), der eine *cis*-Pro Amidbindung aufweist.<sup>[246]</sup> Die Struktur wird über zwei *trans*-annulare Wasserstoffbrücken zwischen Val<sup>3</sup> und Gly<sup>6</sup> fixiert, woraus eine globale *anti*-parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur erhalten wird (siehe Abb. 3.2). In Lösung verdreht sich die Struktur ein wenig. Es werden zwei Wasserstoffbrücken zwischen CO-Val<sup>3</sup>, NH-Val<sup>1</sup> und NH-Gly<sup>6</sup> ausgebildet, wodurch sich der  $\beta$ -I-turn zu einem  $\beta$ -II-turn verändert.<sup>[246]</sup> Die erste Totalsynthese von Segetalin A wurde 2001 von SONNET et al. beschrieben.<sup>[250]</sup> Der finale Macrocyclisierung-Schritt wurde zwischen Alanin und Glycin DPPA-vermittelt durchgeführt und lieferte in 45% Ausbeute das cyclische Hexapeptid. ENCK führte im Rahmen seiner Dissertation bereits reversible Cyclisierungsstudien zu Segetalin A durch und konnte zeigen, dass nicht die erwartete Kopf-Schwanz-Cyclisierung auftritt.<sup>[234]</sup> Die Imin-Bildung sollte zwischen Val<sup>1</sup> und Gly<sup>6</sup> erfolgen, da der Glycinaldehyd, wie bereits beschrieben, als einziger Aminoaldehyd nicht racemisiert und demnach zusätzliche Signale in der NMR-Spektroskopie vermieden werden können. Die Synthese der C-terminalen Peptidaldehyde wurde im Fall des Segetalin A angewendet und der entsprechende Aldehyd, ein Fmoc-geschützter Glycinaldehyd **8**, kovalent über ein bereits am NovaSyn®TG-Harz **9** befindliches L-Thr-Gly Dipeptid an die feste Phase gebunden (siehe Schema 3.4, S. 37).<sup>[228]</sup> Die Peptidsynthese erfolgte nach Standardbedingungen. Die auf diesem Weg erhaltenen Peptide **12/12a** wurden mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt und für NMR-spektroskopische Messungen in einem Phosphatpuffer H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:1) bei pH 3 gelöst.<sup>[251]</sup>



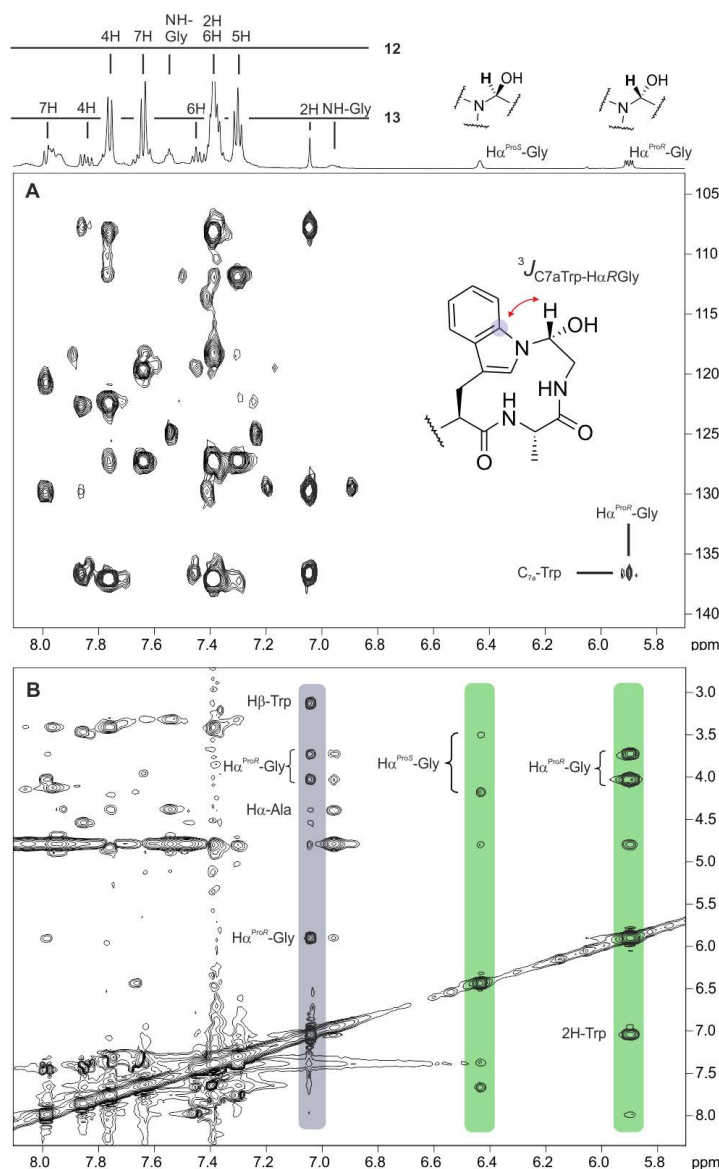
**Schema 3.5** Reversible Cyclisierung des Segetalin A Aldehyds in wässrigem Phosphat-Puffer. Das Peptid **12** cyclisiert bereits bei einem pH-Wert von 6.5 zu einem 12-gliedrigen Hemiaminal **13**, in einem Diastereomenverhältnis von 60:40, anstatt das erwartete cyclische Imin **14a** mit der *cis*-Pro Amidbindung zu bilden. Die Oxidation des Hemiaminals **13** mit TPAP und NMO in Acetonitril ergibt das cyclische Amid **15**, das zum linearen Segetalin A **16** hydrolysiert (siehe Kapitel 3.1.4). Durch Methylierung des Indol NHs zu Peptid **12a** wird die Seitenketten-Cyclisierung verhindert und selbst in diesem Fall wurde keine Macrocyclisierung zu **14b** beobachtet.<sup>[251]</sup>

Bei diesem pH-Wert liegt das offenkettige, lineare Peptid **12** vor, das bei Erhöhung des pH-Wertes auf 6.5 zum cyclischen Halbaminal, bzw. nach Abspaltung von Wasser zum entsprechenden macrocyclischen Imin **14a** reagieren soll. Wird das offenkettige Derivat des Peptids Segetalin A cyclo[-Val-Pro-Val-Trp-Ala-Gly] der reversiblen Imin-Cyclisierung unterworfen, um dessen Neigung zur Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung zu quantifizieren, so ist weder die Struktur des gebildeten Rings **13** noch die Art der kovalenten Bindung – ein Indolhalbaminal – mit bekannten Peptiden vergleichbar (siehe Schema 3.5).<sup>[251]</sup> Der Segetalin A Aldehyd **12** zeigt keinerlei Tendenz zur Ausbildung eines 18-gliedrigen Rings, obwohl mit Gly und Pro zwei Aminosäuren enthalten sind, die dem Ringschluss förderlich sein sollten.<sup>[52,252,253]</sup> Im Folgenden werden die Strukturaufklärung und die Konformationsanalyse von **13** beschrieben, um in einer überraschenden Analogie zum  $\gamma$ -turn eine Begründung für den Ringschluss über die Seitenkette zu finden. Von Segetalin A ist bekannt, dass es eine Vorzugskonformation (Hauptkonformation) ausbildet, wobei im <sup>1</sup>H-NMR nicht einmal ein zweiter Signalsatz für das (*E*)-Pro Rotamer beobachtbar ist.<sup>[246,250]</sup> Experimentell ist dabei jedoch nicht unterscheidbar, ob es sich bei dem Ring um eine gespannte und energiereiche Konformation oder um ein durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiertes Energieminimum handelt. Erst der Ersatz einer Amidbindung [CONH] durch die isostere Imin-  $\Psi[\text{CH}=\text{N}]$  bzw. Iminium-Bindung  $\Psi[\text{CH}=\text{NH}^+]$  kann eine Antwort auf die Frage geben, ob das Hexapeptid bevorzugt linear oder cyclisch vorliegt. Alle beteiligten Molekülspezies sind NMR-spektroskopisch unterscheidbar und können somit pH- und temperaturabhängig quantifiziert werden.<sup>[251]</sup> Erfolgt die reversible Kondensation zwischen dem N-terminalen Amin und dem C-terminalen Aldehyd aus dem Hydrat des Aldehyds, so müssen zwei Moleküle Wasser in der VAN'T HOFF-Analyse berücksichtigt werden. Wird der Peptidaldehyd **12** bei pH = 3 in wässrigem Phosphatpuffer gelöst, liegt dieser, wie in Abb. 3.3 zu sehen, fast ausschließlich in offenkettiger Form vor. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf 6.5 ist eine Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung zum makrocyclischen 18-gliedrigen Ring **14a** zu erwarten. Bei diesem pH-Wert gewinnt der neue Signalsatz bei höherer Messtemperatur (320 K) an Intensität, wie es für einen Ringschluss dieser Art zu erwarten ist. Darin ist die Cyclisierung des Aldehyds mit dem NH-Indol des Tryptophans, unter Bildung eines 12-gliedrigen Rings **13** in einem *R/S*-Stereoisomerenverhältnis von 60:40 (siehe Abb. 3.3) nachweisbar. Der gebildete Ring kann jedoch nicht dem erwarteten Makrocyclus zugeordnet werden. Im HMBC-Spektrum wird das lassoartige Halbaminal **13** identifiziert (siehe Abb. 3.4).<sup>[251]</sup>



**Abbildung 3.3** WATERGATE-<sup>1</sup>H-NMR von **12/13** (600 MHz, 300 K bis 320 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) um den Bereich der Amid-Protonen. Signale des offenkettigen Peptids **13** sind orange und der bei pH-Wert-Erhöhung auf 6.5 entstehende Signalsatz des Halbaminals **13** grün markiert. Gekennzeichnet sind jeweils der Signalsatz des *S*- und *R*-Enantiomers. Bei einem pH-Wert von 6.5 und Erhöhung der Temperatur auf 320 K stellt sich ein Gleichgewicht von **12/13** von 70:30 ein. Die Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung und Bildung von Oligomeren liegt unter 1%.<sup>[251]</sup>

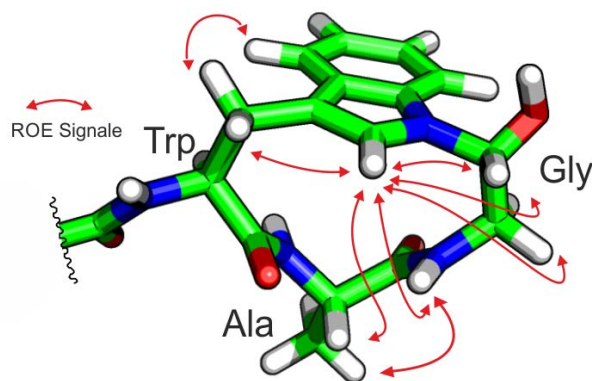
Das maximale Verhältnis von linear zu cyclisch beträgt 70:30 bei einer Temperatur von 320 K und einem pH = 6.5. Bei Blockierung des NH-Indols durch Methylierung (**12a**) und anschließender pH-Titration von pH = 3 → 6.5 entsteht hingegen kein zusätzlicher Signalsatz. Das Peptid **12a** liegt selbst bei erhöhter Temperatur von 320 K ausschließlich offenkettig vor. Die aufgrund der unterdrückten Reaktivität des NH-Indols erwartete Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung sowie die Bildung von Oligomeren werden nicht beobachtet. Die geringe Neigung des Segetalin A Aldehyds **12** zur Cyclisierung wird mit der bevorzugt gestreckten Konformation der N-terminalen Aminosäuren begründet. Im Unterschied zu den meisten Prohaltigen Peptiden wird neben den Signalsätzen für **12**, **12a** und **13** im <sup>1</sup>H-NMR kein weiterer Signalsatz für das (*Z*)-Pro-Rotamer beobachtet. Auch sind in den homonuklearen 2D-Spektren (ROESY und TOCSY) keine Austauschsignale zu einem Nebensignalsatz des (*Z*)-Pro-Rotamers sichtbar. Die (*E*)-Konfiguration Val-(*E*)-Pro-Rotamer wurde über die chemische Verschiebung der β- und γ-CH<sub>2</sub> des Pro<sup>3</sup> (δ = 29.0 und 24.5 ppm) zugeordnet.<sup>[254]</sup>



**Abbildung 3.4** Ausschnitte des HMBC- und ROESY-Spektrums von **12/13** (600 MHz, 310 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 6.5). Das HMBC-Spektrum zeigt blau unterlegt die Kreuzsignale des C<sub>7a</sub>-Trp von **13** sowie orange unterlegt ein Kreuzsignal des H<sub>A</sub>Aminal<sup>R</sup>-Gly. Die intensive <sup>3</sup>J-Kopplung des H<sub>A</sub>Aminal<sup>R</sup>-Gly zum C<sub>7a</sub>-Trp resultiert aus dem anti-periplanaren Bindungswinkel und erlaubt Rückschlüsse auf die kovalente Verknüpfung. Das S-Enantiomer zeigt dementsprechend keine <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>-Kopplung. Im unteren ROESY-Spektrum sind die Kreuzsignale des H<sub>A</sub>Aminal<sup>R</sup>-Gly und des S-Enantiomers grün und die ROE-Signale des 2H-Indols blau hervorgehoben. Die jeweiligen Kreuzsignale des 2H-Indols dienen als Basis für die energieminierte Durchschnittskonformation in Abbildung 3.5.<sup>[251]</sup>

Die gestreckte Konformation wird durch die, über die gesamte Peptidkette von **12** verfolgbaren, relativ schwachen ROEs NH<sup>i</sup>-Hα<sup>i</sup> und intensiven Hα<sup>i</sup>-NH<sup>i+1</sup> bestätigt. Die Seitenkette des Tryptophans ist flexibel genug, um sich dem C-Terminus anzunähern und das Peptid über das NH-Indol cyclisieren zu lassen. Die entsprechende HMBC- und ROESY-Spektren sind zusammen in Abbildung 3.4 dargestellt. In dem HMBC-Spektrum lässt sich das Kreuzsignal erkennen, das durch die <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>-Kopplung zwischen dem H<sub>A</sub>Aminal<sup>R</sup>-Gly und dem C<sub>7a</sub>-Trp hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Kopplung und den nachfolgenden ROE-Signalen kann auf die postulierte kovalente Struktur von **13** geschlossen werden. Die hohe Intensität

des Kreuzsignals beruht auf der *anti*-periplanaren Anordnung der Bindungen, wie in der energieminierten dreidimensionalen Struktur (siehe Abb. 3.5) erkennbar ist. Die vorgeschlagene Struktur in Abbildung 3.5 basiert auf ROE-Signalen, die im ROESY-Spektrum ausgehend vom 2H-Indol des *R*-Stereoisomers aufgeführt sind. Die entsprechenden Signale sind grün dargestellt. Die ROE-Signale des  $H_{\text{Aminal}}^R\text{-Gly}$  und des diastereomeren  $H_{\text{Aminal}}^S\text{-Gly}$  sind mit Balken unterlegt. Die Unterscheidung der zwei möglichen, planar chiralen Stereoisomere erfolgt über das Netzwerk lokaler ROEs, welche das 2H der Indol-Seitenkette ausbildet (Pfeile in Abb. 3.5). Die ROE-Signale zum  $H_{\alpha}\text{-Trp}$  konnten nicht identifiziert werden, da die chemische Verschiebung im Bereich der Wasserunterdrückung liegt. Zu erkennen sind die ROE-Signale des 2H-Indols zum  $H\beta^{\text{Pro.S.}}\text{-Trp}$ ,  $H_{\alpha}\text{-Gly}$ ,  $H_{\alpha}\text{-Ala}$ ,  $H_{\text{Aminal}}^R\text{-Gly}$  und  $\text{NH-Gly}$ .

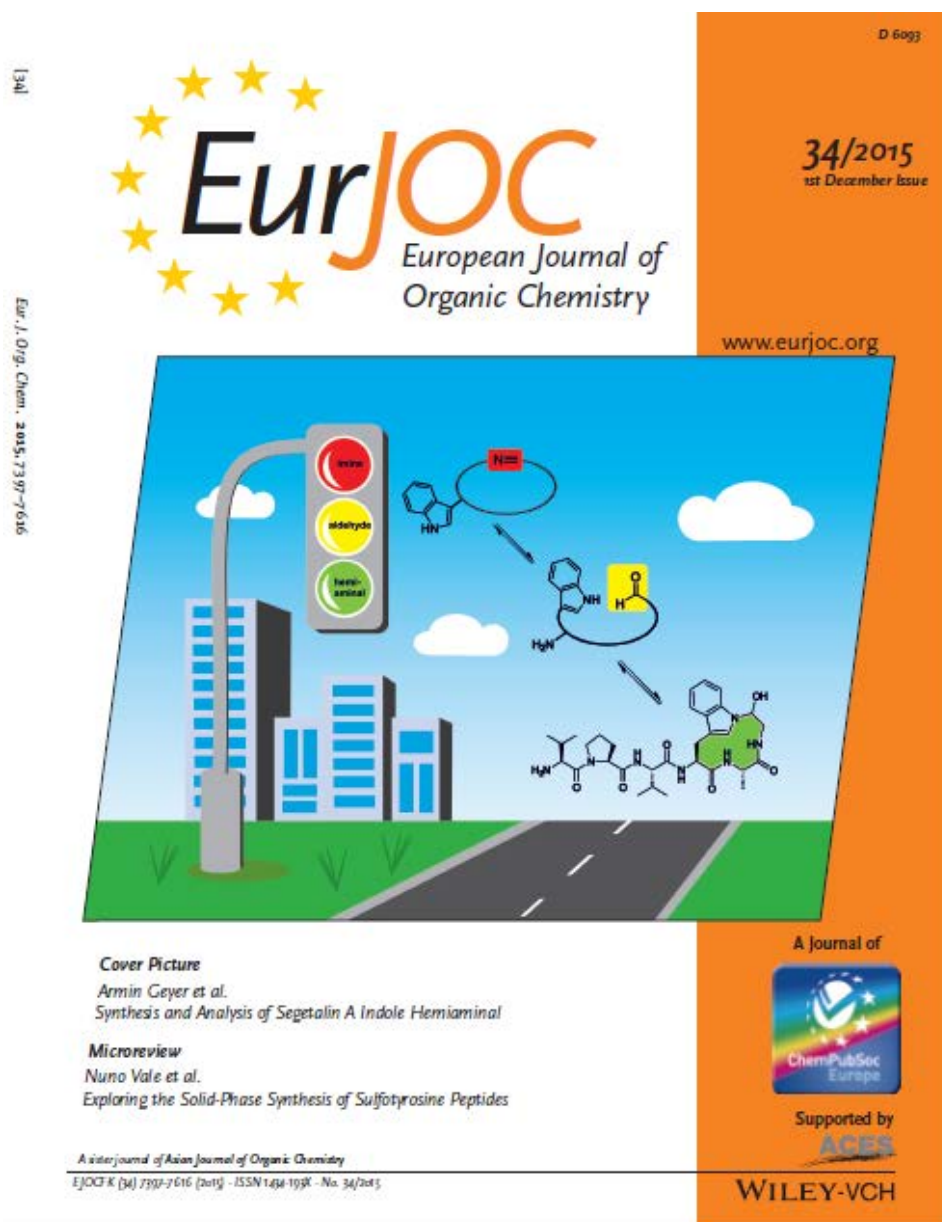


**Abbildung 3.5** Energieminimierte Durchschnittskonformation des kovalent geknüpften Halbaminals **13** basierend auf ROE-Signalen ausgehend vom 2H-Indol, berechnet mittels HyperChem®. Gezeigt ist der terminale 12-gliedrige Ring. Die jeweiligen ROE-Proton-Proton-Wechselwirkungen sind durch entsprechende Pfeile gekennzeichnet. Zu erkennen ist der  $\gamma_i\text{-turn}$  ausgehend vom  $H_{\alpha}\text{-Trp}$  bis zum  $H_{\alpha}\text{-Gly}$  im unteren Teil der Darstellung.<sup>[251]</sup>

Das in Abb. 3.5 gezeigte Halbaminal **13** weist eine große Ähnlichkeit zum Strukturmotiv eines  $\gamma_i\text{-turns}$  auf, worin Ala die zentrale  $i+1$ -Position einnimmt. Das Trp-NH zeigt mit  $-10$  ppb/K eine große Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung, die typisch ist für amidische Protonen, die zum Lösungsmittel orientiert sind. Der deutlich kleinere Temperaturgradient des Ala-NHs ( $-6$  ppb/K) kann mit einer geringeren Lösungsmittelzugänglichkeit begründet werden.<sup>[52,255,53–55]</sup> Typisch für eine Wasserstoffbrücke ist der minimale Wert für Gly-NH von  $-3$  ppb/K, der auf die Koordination zum Trp-CO hinweist. Mit einem Wert von  $\varphi = -102^\circ$  weicht der  $\varphi$ -Torsionswinkel ( $\text{CO}^i\text{-N}^{i+1}\text{-C}\alpha^{i+1}\text{-CO}^{i+1}$ ) des Alanins um ca.  $-20^\circ$  vom erwarteten Wert der  $\gamma_i\text{-turn}$  nach unten ab. Dieses wird allerdings durch die umgekehrte Abweichung von ca.  $+20^\circ$  ( $\psi = +93^\circ$ ) des  $\psi$ -Torsionswinkels ( $\text{N}^{i+1}\text{-C}\alpha^{i+1}\text{-CO}^{i+1}\text{-N}^{i+2}$ ) weitgehend kompensiert. Die im Vergleich zum  $\gamma_i\text{-turn}$  größeren Zahlenwerte führen zu einer insgesamt gestreckteren Konformation des  $\gamma_i\text{-turns}$ , was jedoch die charakteristische intramolekulare Wasserstoffbrücke Gly-NH-Trp-CO nicht beeinträchtigt. Ausgehend von der überraschenden Beobachtung, dass ein offenkettiges Derivat des Hexapeptids Segetalin A



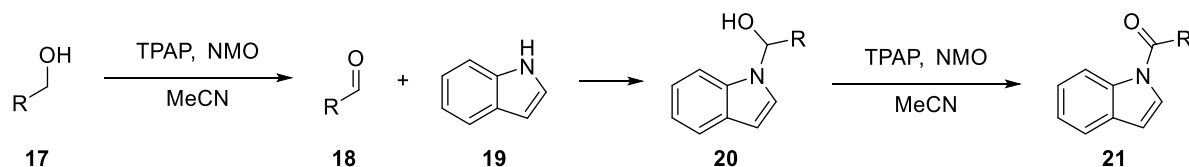
trotz zweier abknickender Aminosäuren Pro und Gly keine Tendenz zum makrocyclischen Ringschluss zeigt, lassen sich aus dem alternativen Cyclisierungsprodukt **13** interessante Anregungen für die Peptidsynthese gewinnen. Denn das offenkettige Peptid bildet in wässriger Lösung eine Ringstruktur aus, die mit Kupplungsreagenzien in denaturierenden organischen Lösungsmitteln nicht beobachtet wird. Im Rahmen der Veröffentlichung dieser Ergebnisse wurde die Arbeit auf dem Titelblatt des *European Journal of Organic Chemistry* abgebildet (siehe Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6** Titelbild der Ausgabe 34/2015 des *European Journal of Organic Chemistry* (EJOC). Gezeigt ist die Gleichgewichtskonkurrenzreaktion des Segetalin A Aldehyds **12** (gelb) zum macrocyclischen Imin **14a** (rot), das nicht gebildet wird und dem Indol-Halbaminal **13** (grün), das durch die Gleichgewichtseinstellung entsteht. Als makroskopisches Beispiel dient der Vergleich mit einem Ampelsystem.<sup>[256]</sup>

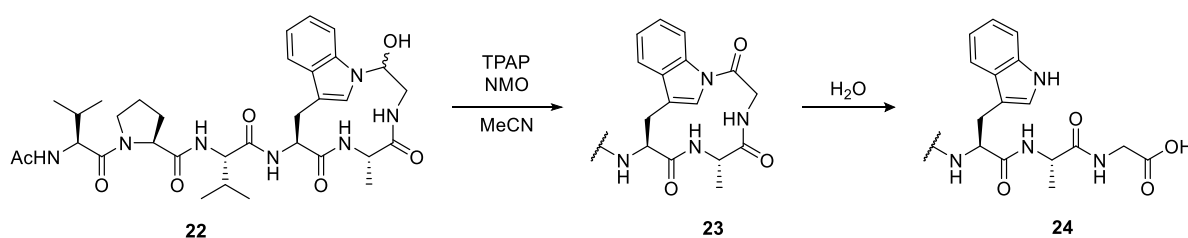
### 3.1.4 Oxidation des Segetalin A Halbaminals

Halbaminale können isoster zu sekundären Alkoholen unter geeigneten Oxidationsbedingungen zu Amiden oxidiert werden. Die oxidative Acylierung von Indolen wurde von MAKI et al. bereits in einer Kupplung von Indol mit primären Alkoholen etabliert.<sup>[257]</sup> Mit TPAP als Oxidationsmittel und NMO als Cooxidans werden primäre Alkohole **17** unter wasserfreien Bedingungen in einer LEY-GRIFFITH Oxidation zum Aldehyd **18** oxidiert und nach Addition des Indols **19** entsteht ein stabiles Halbaminal **20**, das erneut von TPAP zum Amid **21** oxidiert werden kann (siehe Schema 3.6).<sup>[258]</sup>



**Schema 3.6** Oxidative Kupplung eines primären Alkohols **17** und Indol **19** unter milden Bedingungen zum Amid **21**. Ausbeuten von bis zu 80% sind bei 25 °C Reaktionstemperatur und einer Konzentration von 0.6 M in Acetonitril möglich.<sup>[257]</sup>

Durch die milden Reaktionsbedingungen wurde die Reaktion zunächst in Zusammenarbeit mit LU YANG im Rahmen ihrer Bachelorarbeit mit Tryptophan-Derivaten und einfachen primären Alkoholen durchgeführt und analysiert.<sup>[259]</sup> Durch die durchweg positiven Ergebnisse wurde die Reaktion auf das Segetalin A Halbaminal übertragen und die Oxidation des peptidischen Halbaminals untersucht. Die Oxidation wurde mit einem N-acetylierten Segetalin A Aldehyd, welcher das Halbaminal **22** bildet, in Acetonitril bei Raumtemperatur durchgeführt und mittels HPLC und Massenspektroskopie charakterisiert (siehe Schema 3.7).



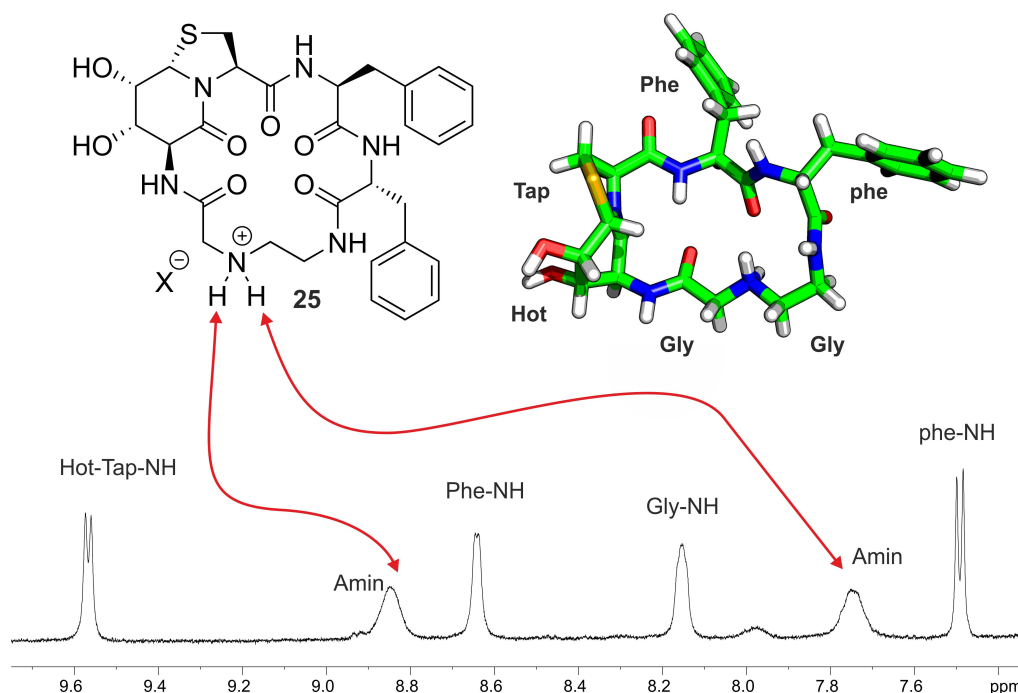
**Schema 3.7** TPAP-Oxidation des peptidischen Halbaminals **22** zum Amid **23**, das leicht durch saure Aufarbeitung zum linearen N-acetylierten Segetalin A **24** hydrolysiert. Die direkte Oxidation des Aldehyds zur Säure **24** wird aufgrund wasserfreien Bedingungen ausgeschlossen.

Massenspektroskopisch konnte das erwartete Amid **23** als Nebenprodukt identifiziert werden. Als Hauptprodukt wurde lineares N-acetyliertes Segetalin A **24** isoliert, das durch Hydrolyse des Amids oder Oxidation des Aldehyds entsteht. Der Grund für die geringe Ausbeute und schwierige Isolierung des Amids ist die hohe Reaktivität von 12-gliedrigen Acyl-Indolen, die in einem ähnlichen Motiv von KATRIZKY als Intermediate zur Ligation verwendet werden.<sup>[260]</sup> Dieses erklärt die leichte Hydrolyse des Amids zur Carbonsäure. Halbaminale, die von N-terminalen Peptidaminen gebildet werden, können unter

Wasserabspaltung weiter zu cyclischen Imin-Peptiden reagieren. Die Oxidation dieser zu Amiden wurde ebenfalls von LU YANG im Rahmen ihrer Bachelorarbeit in einer PINNICK-Oxidation untersucht.<sup>[259,261,262]</sup> Die hohe Komplexität dieser Reaktion sowie der Substrate führte zu keinen isolierbaren Peptiden, wodurch ein Abfangen der cyclischen Halbaminale/Imine mit oxidativen Methoden nicht weiter verfolgt wurde. Neben der Oxidation ist die Reduktion von Iminen bzw. Iminium-Ionen stark etabliert und wird oft im Rahmen von reduktiven Aminierungen durchgeführt.<sup>[263–267]</sup> Der Vorteil dieser Reaktion liegt in der breiten Anwendbarkeit und den milden Bedingungen, die eine hochselektive Reaktion selbst in peptidischer Umgebung ermöglichen. Reduktive Aminierungen von C-terminalen Peptidaldehyden werden im folgenden Kapitel behandelt.

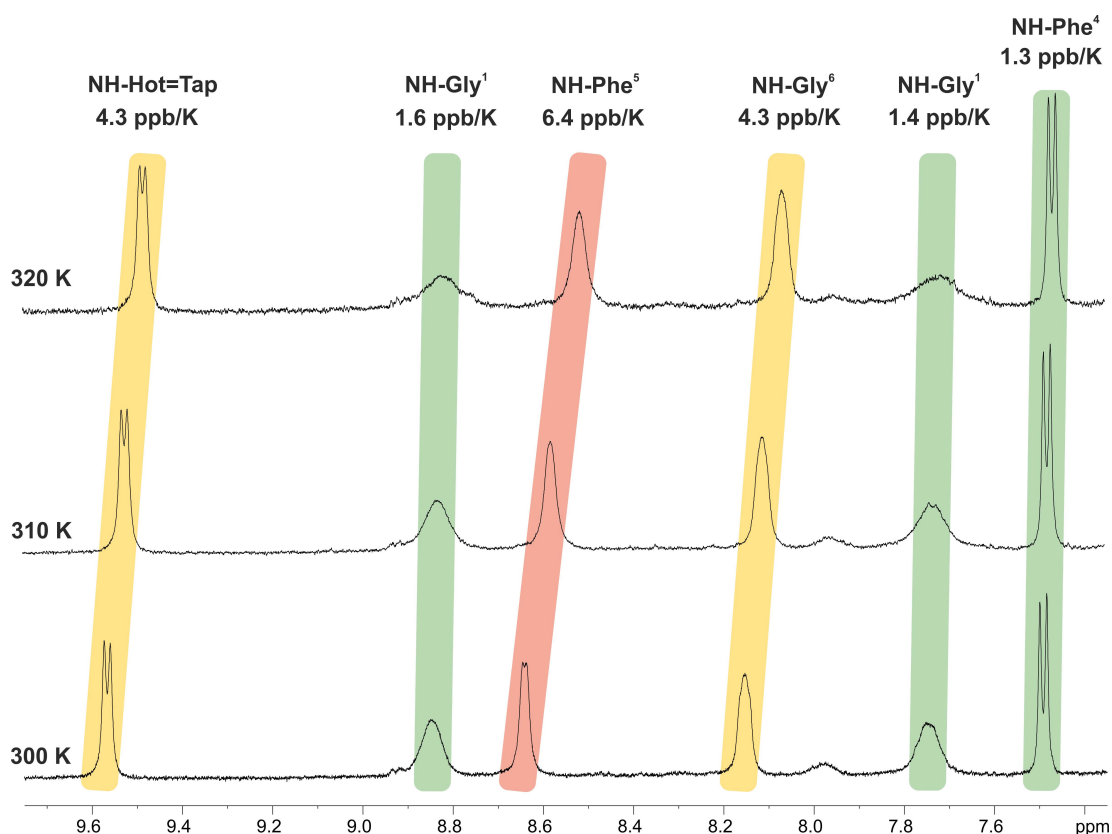
### **3.1.5 Cyclisierung eines Hexapeptids mittels reduktiver Aminierung**

Reduktive Aminierungen als Folgereaktion und zur kovalenten Fixierung von Imin-Peptiden wurden ausgiebig untersucht und optimiert. Basierend auf unterschiedlichsten Substraten und Reaktionsbedingungen wurde eine große Bandbreite an Reagenzien zur reduktiven Aminierung entwickelt.<sup>[266]</sup> Verwendung finden beispielsweise Pyridin- und Picolin-Boran-Komplexe<sup>[263,264,267,268]</sup> oder elektrochemische Verfahren. Besonders etabliert haben sich modifizierte Borane wie  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ <sup>[269]</sup> oder  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ .<sup>[270]</sup> Diese sind einfach zu handhaben und bieten eine hohe Substratbreite bei bioorganischen Molekülen. Um reduktive Aminierungen mit Peptidaldehyden durchzuführen, wurde in Zusammenarbeit mit JOHANNA PLAG in ihrer Bachelorarbeit ein lineares Hexapeptid Gly-Hot=Tap-Phe-phe-Gly-CHO synthetisiert, das mit Hot=Tap ein *turn*-Mimetikum aufweist, welches starke  $\beta$ -*turn* induzierende Eigenschaften besitzt.<sup>[271]</sup> Mit Hilfe einer D-Aminosäure sollte zusätzlich die Cyclisierung begünstigt werden.<sup>[247]</sup> Es sollte gewährleistet werden, dass ein Hexapeptid erhalten wird, das eine inhärente Cyclisierungstendenz aufweist und die reduktive Aminierung leicht ermöglicht. Die Synthese wurde, wie bereits beschrieben, über ein 2-CTC-Harz durchgeführt und nach Abspaltung der Peptidaldehyd als Rohprodukt erhalten. Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen analysiert und mit  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  (5:1) sowie zwei Äquivalenten Natriumcyanoborhydrid die besten Bedingungen ermittelt. Bei unvollständigem Umsatz wurde die Reaktion auf 45 °C erwärmt, bis mittels HPLC die Vollständigkeit der Reaktion nachgewiesen werden konnte. Zur Vermeidung von Oligomerisierung der Peptidaldehyde wurde eine Konzentration von 0.1 mM gewählt.<sup>[272]</sup>



**Abbildung 3.7** Reduktive Aminierung zum cyclischen Hexapeptid **25** mit Hot=Tap als *turn*-Mimetikum. Das chemisch instabile Imin wird mittels Natriumcyanoborhydrid reduziert und ein konformationell stabiles, sekundäres Ammonium-Ion erhalten. Eine exakte Unterscheidung des diastereotopen Protonenpaares des Ammonium-Ions in *proR* und *proS* konnte aufgrund der noch zu flexiblen Alkylkette nicht durchgeführt werden. Basierend auf den NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde mittels HyperChem® eine energieminierte Durchschnittskonformation ermittelt.

Erhalten wurde das cyclische Hexapeptid **25** mit einer NH-Signaldispersion von über einem ppm und einer diastereotopen Ammoniumgruppe, die im  $^1\text{H}$ -NMR zugeordnet werden konnte. Die exakte Unterscheidung des diastereotopen Protonenpaares in *proR* und *proS* konnte aufgrund der zu flexiblen Alkylkette von **25** nicht durchgeführt werden. (siehe Abb. 3.7). Die hohe Dispersion der NH-Signale ist bereits ein Indiz für die erfolgreiche Macrocyclisierung, die anhand von 2D-NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. In Lösung wird die gebildete Struktur durch Hot=Tap auf der einen Seite und durch ein  $\beta$ -I-*turn* auf der gegenüberliegenden Seite stabilisiert. Dieser  $\beta$ -I-*turn* ist aufgrund der beiden nicht-proteinogenen Aminosäuren D-Phe und Gly-CHO etwas verdrillt, kann aber die auftretenden Temperaturabhängigkeiten der amidischen Protonen gut erklären. Bereits in Abb. 3.7 wird in der energieminierten Durchschnittskonformation von **25** ersichtlich, dass mit NH-Phe<sup>4</sup> und CO-Gly<sup>1</sup> sowie mit NH-Gly<sup>6</sup> und CO-Phe<sup>4</sup> zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Die Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen sollten daher deutlich geringer sein, als die der zum Lösungsmittel hin orientierten Protonen. In Abbildung 3.8 sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei 300 K, 310 K sowie 320 K gezeigt und die entsprechenden Temperaturgradienten dargestellt.

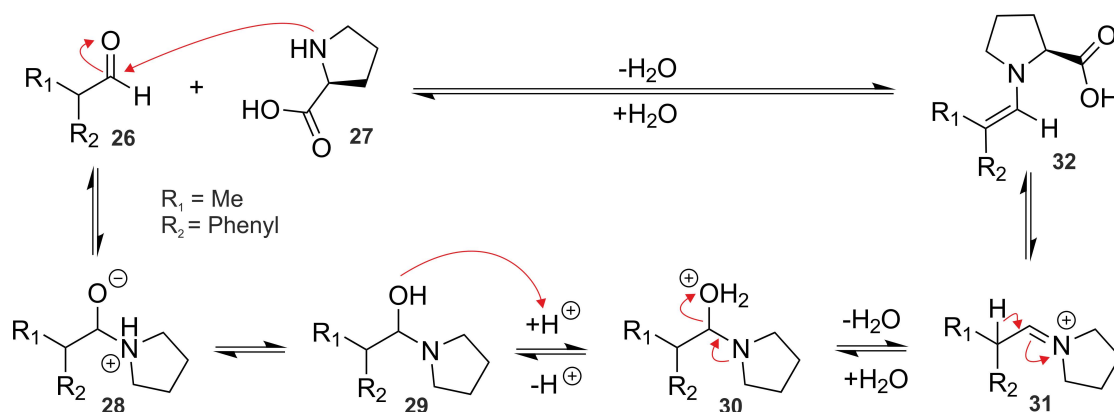


**Abbildung 3.8** (500 MHz, 300 K bis 320 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) Bereich der NH-Protonen als Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des reaktiv cyclisierten Peptids **25**. Die Temperaturgradienten sind mittels Ampelfarben semiquantitativ dargestellt. Eine geringe Temperaturabhängigkeit wurde grün, eine starke rot hervorgehoben. Es ist zu erkennen, dass NH-Gly<sup>1</sup> und NH-Phe<sup>4</sup> geringe Gradienten, hingegen die restlichen NH-Protonen große Gradienten aufweisen. Dies ist auf die Struktur des cyclischen Peptids zurückzuführen. Kleine Temperaturgradienten weisen auf Protonen, die in Wasserstoffbrückenbindungen gebunden sind, hin und große Gradienten charakterisieren Protonen, die dem Lösungsmittel zugewandt sind.

Zu erkennen sind amidische Protonen, die stark (rot) oder wenig (grün) von der Temperatur abhängig sind. Dieses lässt einen Rückschluss auf die Struktur des Peptids zu, da geringe Gradienten ein Zeichen für stark eingebundene Protonen sind. Am häufigsten bilden diese Protonen Wasserstoffbrücken aus.<sup>[273,274]</sup> Große Temperaturgradienten sind ein Indiz für Protonen, die zum Lösungsmittel hin orientiert sind und sich in keiner weiteren nicht-kovalenten Wechselwirkung beteiligen. Dies führt zu einer hohen Abhängigkeit der Temperatur.<sup>[51,52,255,53]</sup> Die entsprechenden Temperaturgradienten sind in Abbildung 3.8 aufgeführt und bestätigen die bereits in Abbildung 3.7 vorgeschlagene Struktur des macrocyclischen Peptids.

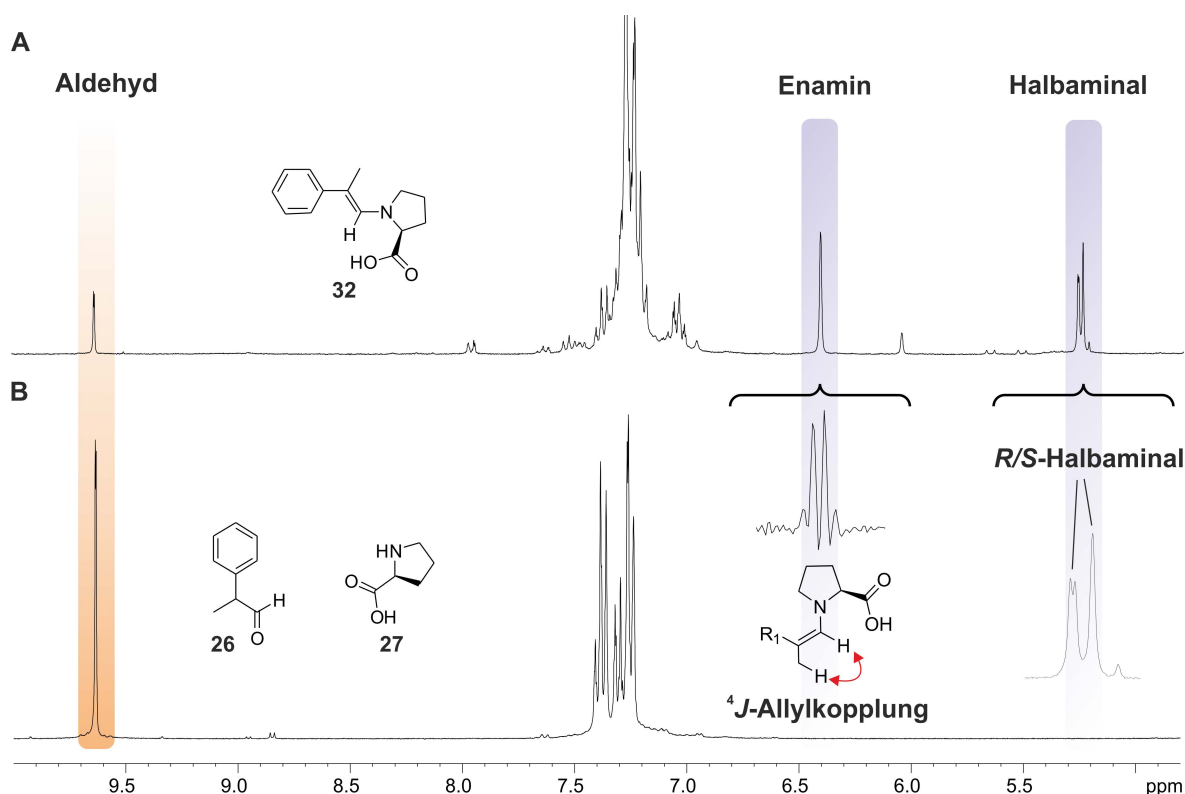
### 3.1.6 Cyclisierung eines Enaminpeptids

Durch N-terminale proteinogene Aminosäuren wird in 19 von 20 Fällen ein Imin-Peptid durch eine Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung eines C-terminalen Peptidaldehyds erhalten. Als Ausnahme gilt Prolin **27**, das als einzige sekundäre Aminosäure kein Imin formen kann, sondern nach Bildung des Iminium-Ions **31** über eine Eliminierung des  $\alpha$ -Protons des Aminoaldehyds zum Enamin **32** weiterreagiert (siehe Schema 3.8). In Zusammenarbeit mit BENEDIKT HEINRICH wurden im Rahmen seiner Bachelorarbeit NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Enamin-Bildung zwischen zwei geschützten Aminosäure-Derivaten und innerhalb eines auf Tyrocidin A basierenden Peptidaldehyds durchgeführt.<sup>[275]</sup>



**Schema 3.8** Reversibler Reaktionsverlauf der Kondensation von Aldehyden **26** mit sekundären Aminen am Beispiel des Hydratrop-Aldehyds und des Prolins **27**. Je nach Reaktionsbedingungen bleibt die Reaktion auf der Stufe des Halbaminals stehen und es findet lediglich die Addition der Reaktionspartner statt.  $\text{R}_1 = \text{Me}$  und  $\text{R}_2 = \text{Phenyl}$ .

In NMR-spektroskopischen Experimenten wurde zur Etablierung der Methode der Hydratrop-Aldehyd **26** als Phenylalanin-Derivat sowie Prolin **27** in  $\text{DMSO-d}_6$  gelöst und die eintretende Reaktion verfolgt. Die NMR-Probe wurde für 1 h bei 40 °C in einem Wasserbad erwärmt und anschließend vermessen. Aufgrund der Reversibilität der Reaktion wurde im Gleichgewicht ein Gemisch aus Enamin **32** (29%), Halbaminal **29** (38%) und Aldehyd **26** (33%) erhalten. Mit Hilfe von HSQC-Spektren konnten die Signale des Enamins (136.4 ppm) und des Halbaminals (102.6 ppm) eindeutig zugeordnet werden. Der Aldehyd bildet mit vorhandenem oder entstehendem Wasser in einer geringen Menge das Hydrat. In Abb. 3.9 sind die entsprechenden Produkte und ein Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums gezeigt. Nach der LORENTZ-GAUSS Transformation ist die  $^4J$ -Kopplung von 1.0 Hz des Allylsystems, das durch die Kondensationsreaktion gebildet wird, zu erkennen. Analog dazu wird das Signal der Methyl-Gruppe als Dublett aufgespalten.

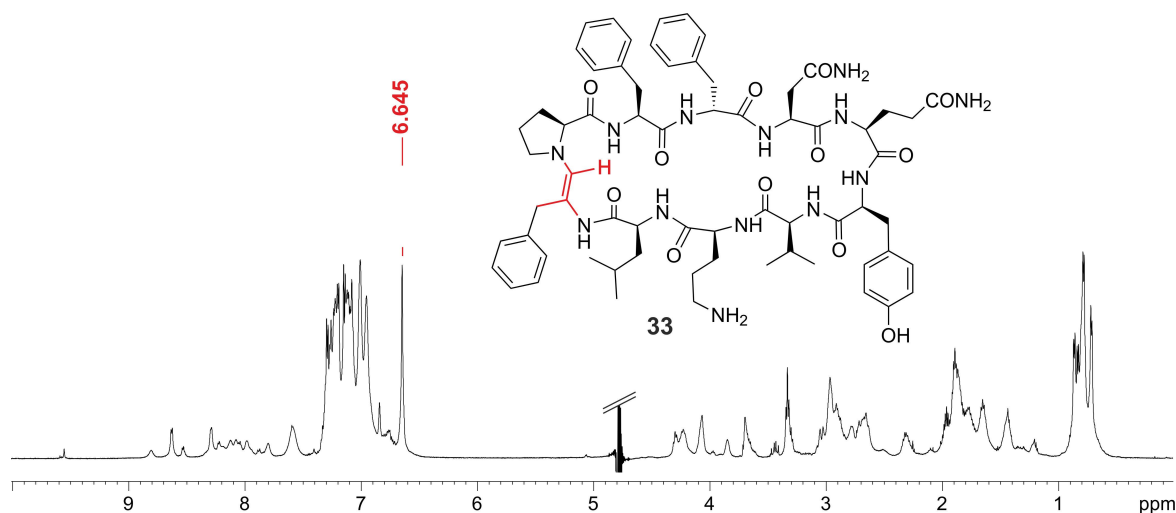


**Abbildung 3.9** (300 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) Bereich der olefinischen und aromatischen Protonen als Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums. Im unteren Spektrum **B**) sind nur Signale des Hydratrop-Aldehyds **26** zu erkennen. Nach Zugabe von Prolin **27** und erwärmen der Lösung auf 40 °C im Wasserbad für 1 h wird das obige Spektrum **A**) erhalten. Das Aldehyd-Signal (orange, 9.63 ppm) wird geringer und es entstehen zwei neue Signalsätze zwischen 6.5 und 5.0 ppm (blau). Diese können dem Enamin **32** (6.41 ppm) und dem Halbamin **29** (5.26 ppm) zugeordnet werden. Nach der LORENTZ-GAUSS Transformation des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums wird die  $^4J$ -Kopplung des erhaltenen Allylsystems mit 1.0 Hz ermittelt.

Ähnliche Kombinationen von Aldehyden und sekundären Aminen führen zu ähnlichen Ergebnissen. Anhand der NMR-Spektren lässt sich schließen, umso höher der ionische Anteil des sekundären Amins ist, desto höher ist der Anteil an gebildetem Halbamin **29**. Es wird vermutet, dass beispielsweise freie Carbonsäuren eine Stabilisierung der Halbamine durch intra-molekulare Wasserstoffbrücken ermöglichen. Die Ringgröße ist bei der Enamin-Bildung ebenfalls entscheidend, da Fünfringe aufgrund ihrer erhöhten Nucleophilie einen höheren Anteil an Enamin bilden.

Die Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei kleinen Molekülen lässt sich gut NMR-spektroskopisch analysieren. Es treten nicht zu viele zusätzliche Zwischenstufen auf und neu entstehende Signalsätze überlappen nur selten. Die Übertragung dieses Protokolls auf größere Systeme wie Peptide oder Proteine wird in Ligationen angewendet, deren Verlauf nicht NMR-spektroskopisch verfolgt wird. Die Macrocyclisierung eines Decapeptids ist weitaus komplexer und die vollständige Zuordnung der Signal nicht immer ohne weiteres möglich.

In Zusammenarbeit mit BENEDIKT HEINRICH konnte dieses im Rahmen des Tyrocidin A Aldehyds Pro-Phe-phe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu-phe-CHO erfolgreich durchgeführt und das macrocyclische Peptid analysiert werden.<sup>[275]</sup> Die Synthese erfolgte, nach den bereits beschriebenen Methoden in Kapitel 3.1.2, mit einem mit Fmoc-Phe-CHO vorbeladenen NovaSyn®TG-Harz. Nach Abspaltung vom Harz und anschließender Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC wurde das Peptid **33** unter physiologischen Bedingungen in einem Phosphat-Puffer bei pH 7 gelöst und mit der WATERGATE-NMR-Spektroskopie analysiert. Neben den intensiven Signalen der Aromaten bei ca. 7 ppm wird ein Singulett bei 6.64 ppm detektiert, das für Peptide unüblich ist und im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nicht näher analysiert werden kann (siehe Abb. 3.10).



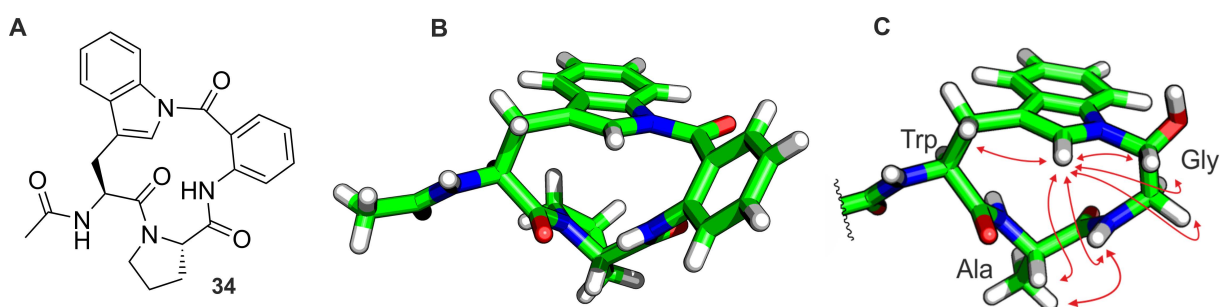
**Abbildung 3.10** WATERGATE-<sup>1</sup>H-NMR von **33** (600 MHz, 300 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7). Das Restsignal der Wasserunterdrückung wurde gekürzt. Bei 9.55 ppm ist das Restsignal des Aldehyds, der nicht vollständig umgesetzt wurde, zu erkennen. Das Singulett bei 6.64 ppm (rot) ist auf den ersten Blick ungewöhnlich und kann anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums nicht eindeutig zugeordnet werden. Das Halbaminale, das als Zwischenstufe gebildet wird, weist eine Verschiebung von 5.07 ppm auf und ist aufgrund der Nähe zum unterdrückten Wassersignal nur schlecht zu erkennen. In der HSQC-Korrelation lassen sich die Zwischenstufe und das Enamin eindeutig zuordnen.

Zur weiteren Analyse des Peptids **33** wurden HSQC, TOCSY und ROESY-Spektren gemessen, wodurch eine genauere Zuordnung der Signale möglich wurde. Im Fall des Singuletts bei 6.64 ppm konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um ein Aromaten-Signal des Tyrosins, sondern um das erwartete Enamin-Signal handelt. Die <sup>13</sup>C-Verschiebung von 130.0 ppm ist vergleichbar mit bereits synthetisierten Enaminen. Das durch die WATERGATE-Pulssequenz partiell unterdrückte Signal des Halbaminals weist eine <sup>13</sup>C-Verschiebung von 90.4 ppm auf, die ebenfalls im erwarteten Bereich liegt. Während der Enamin-Bildung wird das Enamin-Signal durch die Eliminierung des  $\alpha$ -Protons zu einem abgeschlossenen Spinsystem und zeigt im TOCSY- oder COSY-Spektrum keine weiteren Kreuzsignale. Im ROESY-Spektrum ist hingegen eine Vielzahl von ROE-Kontakten zu erkennen, die den Ringschluss bestätigen.



### 3.2 Studien zur Totalsynthese von Psychrophilin E

Im Rahmen der Untersuchungen des Peptidaldehyds Segetalin A (Kap. 3.1.3) wurde nach Naturstoffen mit vergleichbarer Struktur gesucht, um dessen Struktur nach der Synthese mit dem Segetalin A Halbaminal zu vergleichen. Psychrophilin E (**34**) weist ebenfalls ein  $\gamma$ -turn ähnliches Motiv auf und wurde bisher nicht totalsynthetisch hergestellt. Psychrophilin E besteht aus den Aminosäuren Tryptophan, Prolin sowie Anthranilsäure als  $\beta$ -Aminosäure und wurde von PENG et al. im Jahr 2014 neben drei weiteren cyclischen Peptiden aus dem marinen Pilz *Aspergillus versicolor* ZLN-60 isoliert.<sup>[276,277]</sup> Die Amid-Bindung zwischen der Anthranilsäure und dem Indol ist eine strukturelle Besonderheit des Peptids, wodurch ein 13-gliedriger Ring gebildet wird, der dem Halbaminal strukturell ähnelt (siehe Abb. 3.11).

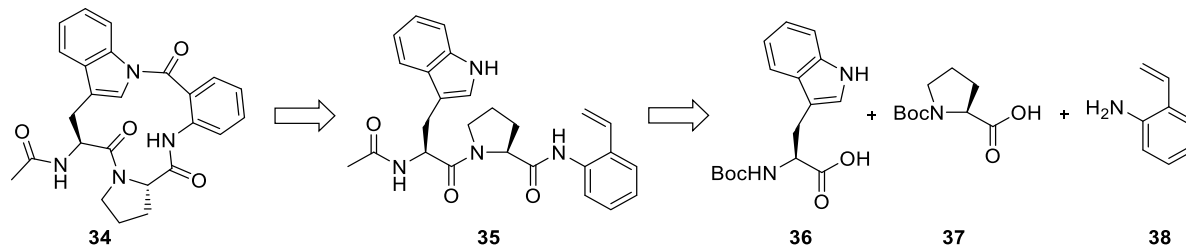


**Abbildung 3.11** Darstellungen des Naturstoffs Psychrophilin E (**34**). **A)** Strukturformel von Psychrophilin E. **B)** Dreidimensionale Darstellung des cyclischen Peptids basierend auf einer Kristallstruktur von PENG et al. mit der CCDC-Nummer: 973003, dargestellt mittels HyperChem®.<sup>[276]</sup> **C)** Direkter Vergleich der Struktur des Segetalin A Halbaminals.

Es sollte ein reversibler Syntheseansatz ähnlich dem Segetalin A durchgeführt werden, indem der Macrocyclus als Indol Halbaminal synthetisiert und anschließend in einer LEY-GRIFFITH Oxidation mittels TPAP und NMO zum Amid oxidiert wird. Ziel war es, vor allem die Halbaminale strukturell zu vergleichen. Als Alternative sollte die indirekte Acylierung des Indols in einem mehrstufigen Reduktions-Oxidationsprozess erfolgen, in dem das Indol zum Indolin reduziert wird, die Acylierung durchgeführt und anschließend das System rearomatisiert wird. Zusätzlich erschwert wird die Synthese durch die *cis/trans*-Isomerie, die in diesem Naturstoff doppelt vorhanden ist. Die bereits angesprochene Indol-Amidbindung sowie die Prolin-Amidbindung enthalten sekundäre Amine, die *cis/trans*-Konformationsisomere bilden können. Der Naturstoff ist ein Reinstoff mit einer *cis*-Amidbindung am Indol und einem *trans*-Prolin-Rotamer.

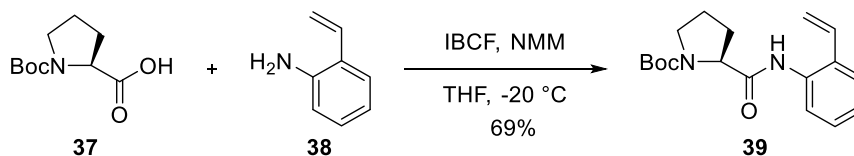
### 3.2.1 Reversibler Syntheseansatz von Psychrophilin E

Basierend auf dem Segetalin A Halbaminal sollte ein reversibler Syntheseansatz für die Totalsynthese von Psychrophilin E (**34**) durchgeführt und im letzten Schritt durch Oxidation das Indol-Amid irreversibel fixiert werden. Es wurde ein linearer Synthesepfad entworfen, der eine schnelle Synthese des Peptidaldehyds ermöglicht (siehe Schema 3.9).



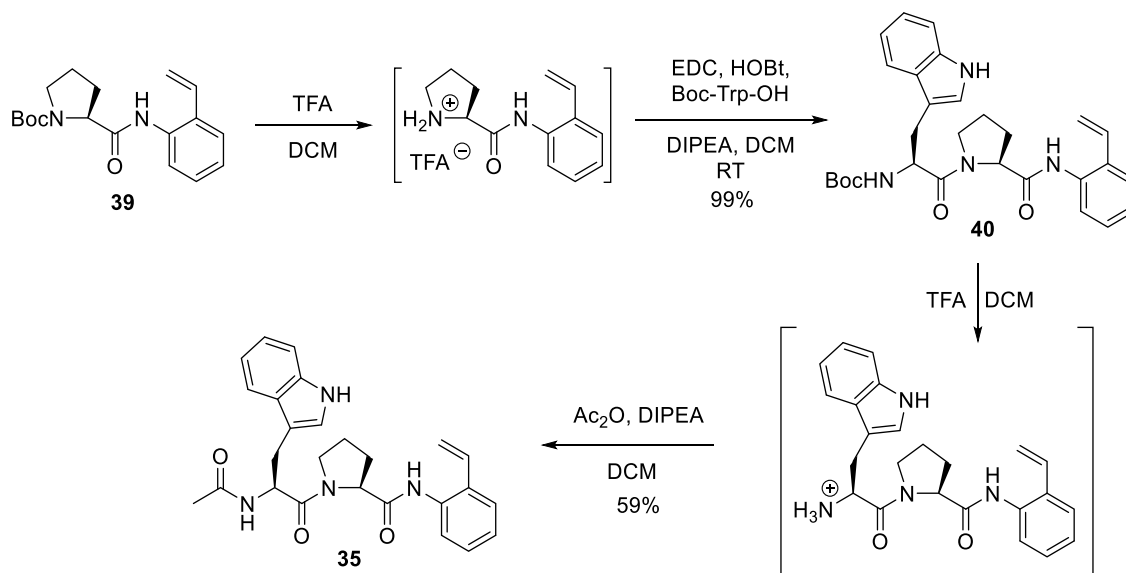
**Schema 3.9** Retrosynthetische Zerlegung von Psychrophilin E (**34**). Das Indol-Amid soll reversibel über ein Halbaminal gebildet werden. Als Schutzgruppe des entsprechenden Aldehyds dient ein Olefin, das chemisch gut zugänglich ist und oxidativ in einer LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation gespalten werden kann. Das Olefinpeptid **35** wird in einer linearen Synthese aus Boc-Tryptophan-OH (**36**), Boc-Prolin-OH (**37**) und 2-Aminostyrol (**38**) hergestellt.

Als Precursor wurde das Aminostyrol-Peptid **35** gewählt, das in einer LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation den entsprechenden Benzaldehyd freisetzen soll. Die Synthese wurde mittels Boc-Strategie in Lösung durchgeführt und mit einer IBCF-vermittelten Kupplung von Boc-Prolin-OH (**37**) und 2-Aminostyrol (**38**) begonnen. Die Kupplung über ein gemischtes Anhydrid liefert gute Ausbeuten und das Dipeptid **39** wurde nach chromatographischer Aufreinigung in 69% erhalten (siehe Schema 3.10).



**Schema 3.10** Synthese des Dipeptids **39**, mittels der gemischten Anhydrid-Methode. Die Reaktion erfolgte mit *Isobutylchlorformiat* (IBCF), *N*-Methylmorpholin (NMM) in THF bei -20 °C und lieferte nach säulenchromatographischer Aufreinigung das Dipeptid **39** in 69% Ausbeute.

Unter Standardkupplungsbedingungen mit HBTU/HOBt konnten lediglich Ausbeuten von 30 bis 40% erhalten werden. Anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums wurde ein *cis/trans*-Verhältnis der urethanischen Schutzgruppe des Prolins mit 40:60 ermittelt. Die Zuordnung des *cis*- und des *trans*-Rotamers erfolgt anhand der charakteristischen Verschiebung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe ( $\delta = 29.0$  und  $24.5$  ppm).<sup>[254]</sup> Das Boc-geschützte Dipeptid **39** wurde säurekatalysiert mittels TFA N-terminal entschützt und ohne weitere Aufarbeitung mit Boc-Trp-OH (**36**) zum Tripeptid **40** umgesetzt, das in einer quantitativen Ausbeute erhalten wurde. Die hohe Ausbeute basiert auf der Reaktivität des sekundären Amins, das bereits mit den Kupplungsreagenzien EDC und HOBt in DCM über Nacht vollständig abreagiert (siehe Schema 3.11).

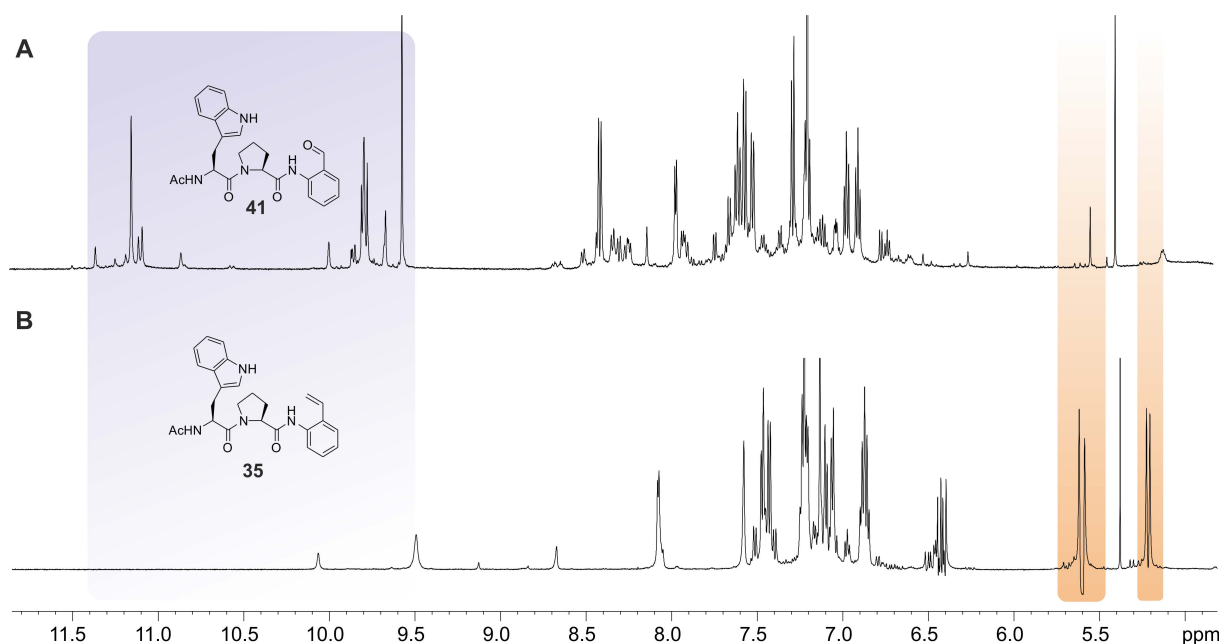


**Schema 3.11** Säurekatalysierte Entschützung des Dipeptids **39** mittels TFA und anschließende Kupplung mit Boc-Trp-OH (**36**) zum Tripeptid **40**. Nach der zweiten säurekatalysierten Entschützung mit TFA erfolgte die Acetylierung analog der Struktur des Naturstoffs. Nach chromatographischer Aufreinigung wurde das Peptid **35** in 59% Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

Das *cis/trans*-Verhältnis der Prolin-Amidbindung beträgt 15:85 im Peptid **40**. Die Substitution der Urethan-Schutzgruppe zur Acetyl-Gruppe in **35** verändert das Verhältnis mit 18:82 marginal. Die Gesamtausbeute des Psychrophilin E Precursor-Peptids **35** beträgt 40% über drei Stufen und zwei chromatographischen Aufreinigungen.

Die oxidative Spaltung des Olefins zum gewünschten Aldehyd wurde im Vorfeld mit acetyliertem 2-Aminostyrol in einer LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation durchgeführt und analysiert. Bereits wenige Minuten nach Zugabe der Kaliumosmat-Periodat-Mischung färbte sich die Reaktionslösung braun, was auf die Bildung des Benzaldehyd-Derivats schließen lässt und eine erfolgreiche Reaktion andeutet. Nach Extraktion konnte der Aldehyd NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Zur oxidativen Spaltung des Olefins im Peptid **35** wurden NMR-Studien der Reaktion in Phosphat-Puffer bei pH 3 durchgeführt, um die Erweiterung des Systems und die Oxidationsstabilität des Indols zu analysieren. Im Idealfall erfolgt direkt nach der oxidativen Spaltung die Addition des Indols an den *in-situ* gebildeten Aldehyd **41** und es entsteht ein dem Segetalin A analoges Halbaminale. In Abbildung 3.12 ist die Umsetzung des Olefinpeptids **35** gezeigt.

Im unteren Spektrum ist das Precursor-Peptid **35** mit dem C-terminalen Styrol-Baustein dargestellt. Die zusätzlichen, kleineren Signalsätze sind auf die bereits erwähnte *cis/trans*-Isomerie des Prolins zurückzuführen. Nach der Zugabe der Kaliumosmat-Periodat-Mischung wird das obere Spektrum erhalten. Deutlich zu beobachten ist das Verschwinden der olefinischen Protonen 5.0 und 6.5 ppm sowie die Entstehung eines aromatischen Aldehyds bei 11.1 ppm.



**Abbildung 3.12**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (WATERGATE, 600 MHz, 300 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3) des Reaktionsverlaufs der oxidativen Spaltung des Olefins des Precursor-Peptids **35** von Psychrophilin E. **A)** Erfolgte oxidative Spaltung des terminalen Olefins durch Zugabe einer Kaliumosmat-Periodat-Mischung. Gut zu erkennen ist die Transformation des Olefins in den entsprechenden Aldehyd **41**. **B)** Unten gezeigt ist das Spektrum des Edukts **35**, das nach Zugabe zum oberen Spektrum abreagiert.

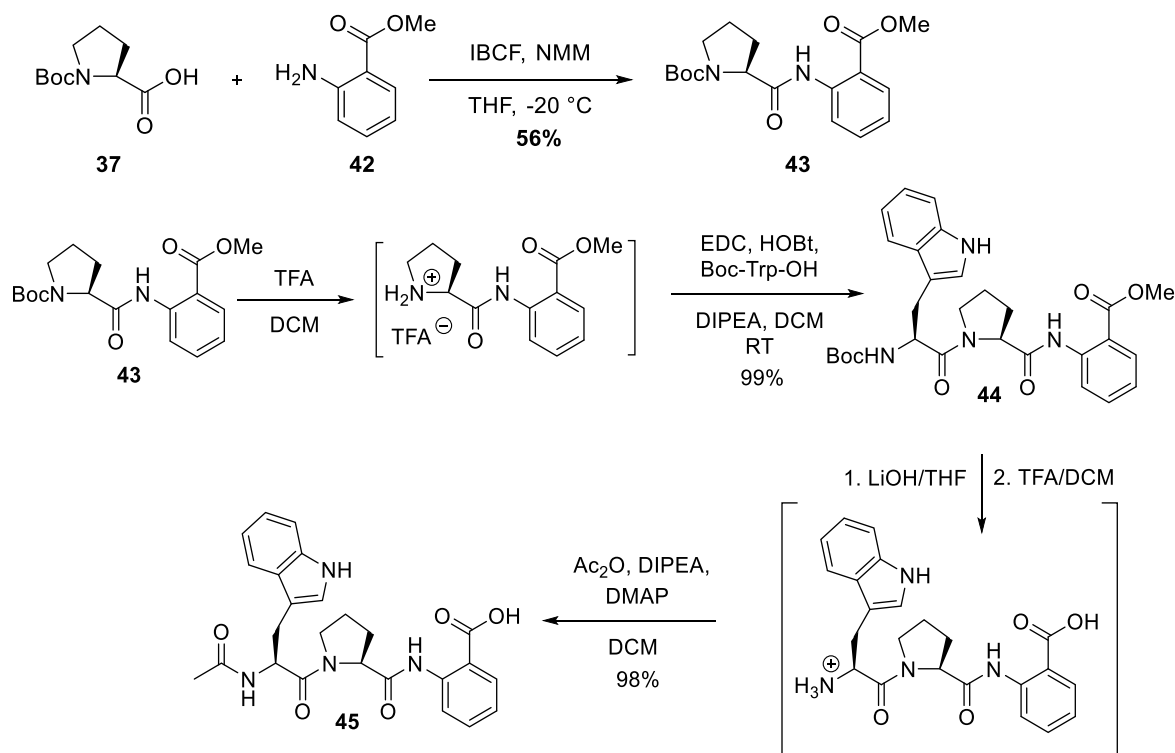
Durch Erhöhung des pH-Werts auf 6 erfolgt keine Bildung des erwarteten Halbaminals. Die Signale werden lediglich breiter und zusätzliche, unspezifische Signalsätze entstehen. Durch die stark oxidativen Bedingungen, die im Rahmen der LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation nötig sind, kann das Indol der Tryptophan-Seitenkette sowie der entstehende Benzaldehyd weiter oxidiert werden. Eine direkte Aufarbeitung und Aufreinigung via präparativer HPLC schlug ebenfalls fehl. Als Alternative wurde die Synthese mit einem Dimethylacetal-geschützten Benzaldehyd-Derivat durchgeführt, sodass die Freisetzung des Aldehyds durch eine saure Hydrolyse erfolgen kann. Es wurde erneut die Zersetzung des Benzaldehyds im Rahmen einer CANNIZZARO-Reaktion beobachtet.

Da beide Synthesewege nicht zu dem gewünschten Halbaminal führten und aufgrund der geringen Stabilität des generierten Aldehyds keine zielführende Alternative in Aussicht stand, wurde der reversible Syntheseansatz verworfen. Um das Zielmolekül dennoch erfolgreich darzustellen, wurde eine irreversible Synthese erarbeitet, die im folgenden Kapitel beschrieben ist.

### 3.2.2 Irreversibler Syntheseseansatz von Psychrophilin E

Basierend auf der chemischen Instabilität von Benzaldehyden konnte die reversible Cyclisierung nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es sollte im Gegensatz zur reversiblen Synthesestrategie eine direkte Acylierung des NH-Indols erfolgen. Aufgrund der geringen Reaktivität des NH-Indols, die nicht für nucleophile Angriffe an Carbonsäureaktivester ausreicht, wurden Strategien entwickelt, welche die Reaktivität des Carbonsäurederivats oder die Nucleophilie des NH-Indols erhöhen.<sup>[257,278,279]</sup>

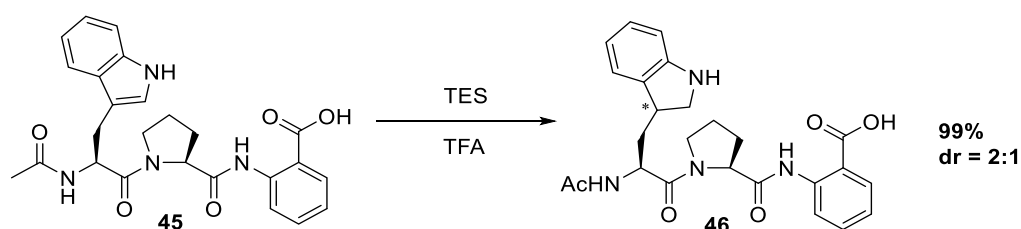
Zunächst wurde ein zu Kapitel 3.2.1 ähnliches Peptid **43** synthetisiert, dessen Synthese mit Anthranilsäuremethylester **42** anstatt mit 2-Aminostyrol beginnt. Die weitere Peptidsynthese wurde analog durchgeführt und das N-acetylierte Peptid **45** in 63% Gesamtausbeute erhalten (siehe Schema 3.12).



**Schema 3.12** Synthese des linearen Psychrophilin E Vorläuferpeptids **45**. Die Synthese beginnt mit einer IBCF-Kupplung zum Dipeptid Boc-Pro-Ant-OMe (**43**) in 56%, das anschließend säurekatalysiert mittels TFA N-terminal entschützt und in einer weiteren Amidkupplung mit Boc-Trp-OH zum Tripeptid **44** in 99% umgesetzt wird. Durch abschließende Umschätzung des N-Terminus und basenkatalysierte Spaltung des Methylesters wird die Verbindung **45** in einer Gesamtausbeute von 63% über drei Stufen in insgesamt fünf Schritten erhalten.

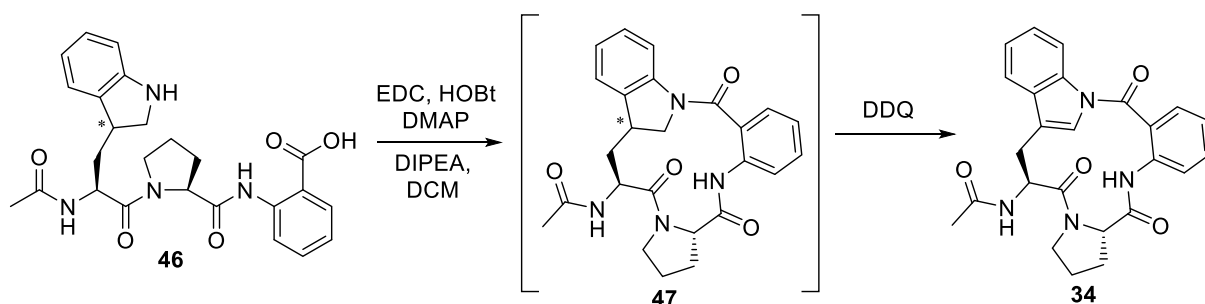
Als Schlüsselschritt der weiteren Synthese wurden verschiedene Kondensationsreaktionen des NH-Indols und der Anthranilsäure durchgeführt und analysiert. Die direkte Acylierung des NH-Indols in **45** konnte nicht durchgeführt werden, da in sämtlichen gängigen Methoden (HBTU in DMF, DPPA in DMF oder DMAP-Katalyse) das Startmaterial zurückgewonnen wurde. Die Nucleophilie des Stickstoffs ist nicht ausreichend genug, um eine von DMAP

aktivierte Carboxyl-Funktion anzugreifen. Die Erhöhung der Nucleophilie mittels selektiver Deprotonierung kann nur bedingt empfohlen werden, da die amidischen Protonen eine höhere Acidität aufweisen und zuerst deprotoniert werden. Eine elegante Methode ist die temporäre Aufhebung des aromatischen Systems von **45** durch die Reduktion der benzyllischen Doppelbindung mit  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  oder Triethylsilan unter sauren Bedingungen.<sup>[280–282]</sup> Die dabei entstehenden Diastereomere **46** können mittels präparativer HPLC voneinander getrennt, isoliert und analysiert werden (siehe Schema 3.13). Basierend auf den NMR-Spektren konnte keine *proR/proS*-Zuordnung der entsprechenden Diastereomere erfolgen.



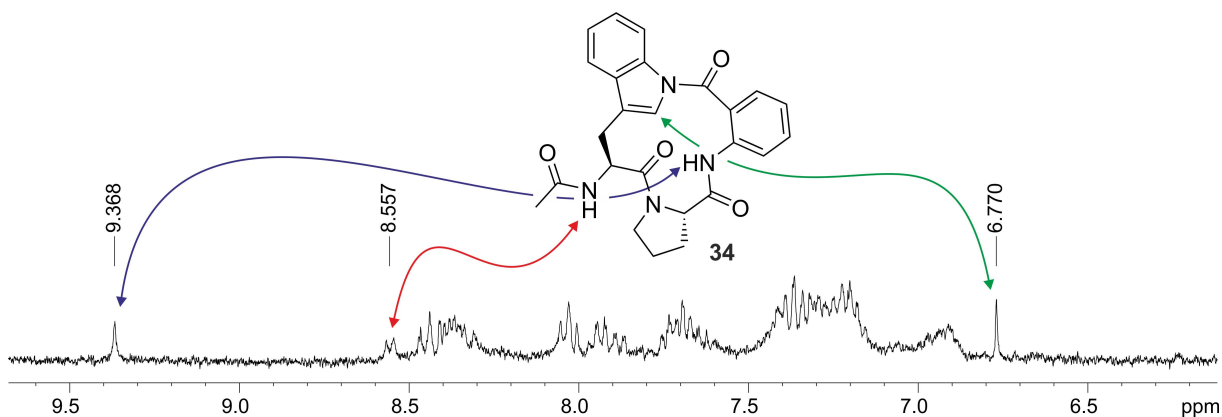
**Schema 3.13** Teilreduktion des aromatischen Systems von **45** durch selektive Reduktion der benzyllischen Doppelbindung mit Triethylsilan in TFA oder  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in Essigsäure. Erhalten wurden beide Diastereomere **46**, die in einem Verhältnis von 2:1 vorliegen, aber NMR-spektroskopisch nicht zugeordnet werden können. Im Fall der Naturstoffsynthese ist dies nicht von großer Bedeutung, da das Stereozentrum durch die Rearomatisierung des Systems aufgehoben wird.

Durch die Dearomatisierung des Indols ist das freie Elektronenpaar des Stickstoffs nicht mehr Teil eines aromatischen Systems und zeigt eine erhöhte Nucleophilie. Die gewünschte Acylierung und Cyclisierung des Tripeptids **46** erfolgte im nächsten Schritt mittels EDC, HOBT und DIPEA in DCM, als Katalysator wurde DMAP hinzugefügt. Das cyclische Peptid **47** konnte lediglich massenspektroskopisch nachgewiesen, jedoch nicht isoliert und weiter charakterisiert werden. Da hauptsächlich das Startmaterial **46** zurückgewonnen wurde, wird von einer großen Ringspannung ausgegangen, die eine Cyclisierung erschwert bzw. das cyclische Produkt wieder leicht hydrolysiert. In einem weiteren Experiment sollte nach erfolgter Cyclisierung der gebildete Macrocyclus wieder oxidativ rearomatisiert und der Naturstoff **34** erhalten werden (siehe Schema 3.14).



**Schema 3.14** Das reduzierte Tripeptid **46** wurde in einer EDC-vermittelten Macrocyclisierung zum cyclischen Peptid **47** umgesetzt, das ohne weitere Aufarbeitung mittels DDQ oxidativ zum Naturstoff **34** rearomatisiert wurde.

In diesem zweistufigen Prozess, indem nach der Cyclisierung das acylierte Indolin **46** im Eintopf-Verfahren mit DDQ zum Indol oxidiert und der Aromat rearomatisiert wurde, konnte NMR-spektroskopisch der Naturstoff **34** durch Vergleich mit den literaturbekannten NMR-Spektren anhand der chemischen Verschiebungen in Spuren identifiziert werden (siehe Abb. 3.13).

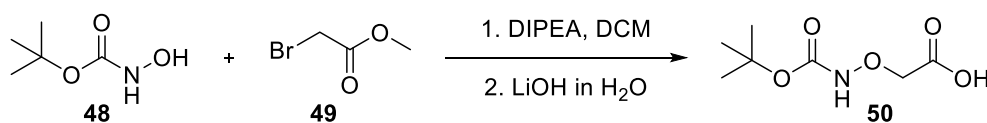


**Abbildung 3.13**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) des Rohprodukts der Cyclisierung nach der Rearomatisierung der Tryptophan-Seitenkette. Die farbig markierten Signale des 2H-Indols (grün), des NH-Trp (rot) und des NH-Ant (blau) entsprechen den literaturbekannten Verschiebungen des Psychrophilin E (**34**) von PENG et al.<sup>[276]</sup>

Das durchgeführte Experiment konnte nicht erfolgreich reproduziert und der Naturstoff auf diesem Weg nicht in größere Menge synthetisiert werden. Es wurden noch weitere Oxidationsmethoden mit  $\text{MnO}_2$  oder  $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt, die aber nicht zum gewünschten Macrocyclus führten.<sup>[283,284]</sup> In sämtlichen durchgeführten Kondensationen wurde das lineare Peptid erhalten. Abschließend lässt sich sagen, dass das lineare Peptid unter den angewendeten Reaktionsbedingungen keine hohe Cyclisierungstendenz aufweist. Die nachfolgende Oxidation und Rearomatisierung verursachte keine weiteren Probleme. Für eine reproduzierbare und erfolgreiche Totalsynthese müsste die Cyclisierung als Schlüsselschritt eingehender untersucht werden.

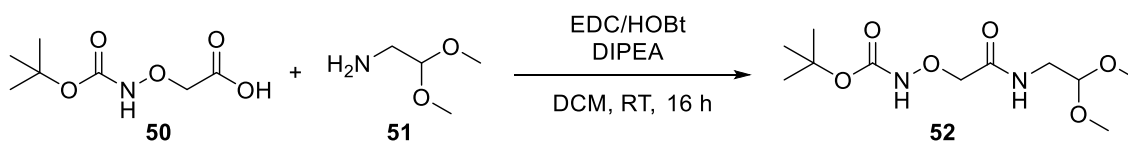
### 3.3 Synthese von cyclischen Aldoxim-Peptiden

Die durch Cyclisierung von C-terminalen Peptidaldehyden erhaltenen Halbaminale und Imine weisen eine hohe Reaktivität auf und zeigen eine geringe Stabilität in wässriger Umgebung. Im Vergleich zu Iminen sind Oxime thermodynamisch stabiler und aufgrund der erhöhten Reaktivität von Hydroxylaminen besser zugänglich. Durch die formale Insertion eines Sauerstoffatoms in die N- $\alpha$ C-Bindung des Glycins wird eine unnatürliche Aminosäure erhalten, die ein sauerstoffgebundenes Hydroxylamin aufweist. Die entsprechende Aminosäure Boc-Goly-OH (**50**) wurde ausgehend von Methylbromacetat (**49**) durch eine nucleophile Substitution mit *tert*-Butyl-*N*-hydroxylcarbammat (**48**) und nachfolgender alkalischer Esterhydrolyse synthetisiert (siehe Schema 3.15).



**Schema 3.15** Darstellung der Aminosäure 2-(Aminooxy)essigsäure (Goly, **50**). Zur besseren Aufreinigung des isolierten Zwischenprodukts wurde die Reaktion mit dem Methylester **49** anstatt direkt mit der Säure durchgeführt.

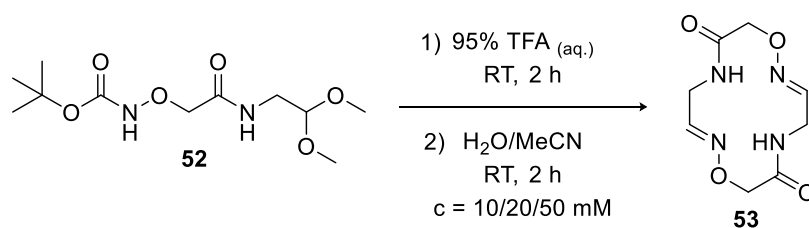
Der synthetisierte Boc-geschützte monomere Baustein **50** kann in der Festphasensynthese als N-terminale Aminosäure eingesetzt werden, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit in Kupplungsreaktionen in Lösung eingesetzt. In einer Testreaktion wurde mittels der EDC/HOBt-Kupplungsmethode das Dipeptid **52**, welches mit Aminoacetaldehyd-Dimethylacetal (**51**) einen geschützten C-terminalen Aldehyd aufweist, synthetisiert. Das Peptid sollte TFA-vermittelt vollständig entschützt und konzentrationsabhängig in wässriger Lösung cyclisiert werden. Schema 3.16 zeigt die Kupplung des entsprechenden Dipeptids **52** mittels EDC/HOBt in DCM.



**Schema 3.16** Kupplung der Boc-geschützten 2-(Aminooxy)essigsäure (Goly, **50**) mit dem Aminoacetaldehyd-Dimethylacetal (Gla, **51**). Die Synthese des Dipeptids **52** erfolgt mittels EDC/HOBt in DCM bei RT für 16 h in 29% Ausbeute.

Durch die Umsetzung mit wässriger TFA (95%ig) wird die Boc-Schutzgruppe säurekatalysiert abgespalten, das Acetal hydrolysiert und aufgrund des niedrigen pH-Werts findet keine vorzeitige Reaktion zum Oxim statt. Die intermolekulare Oligomerisierung und anschließende Cyclisierung wurde durch Zugabe von Wasser initiiert, wobei bereits ein pH-Wert von ca. 3 für die Reaktion ausreicht. Zusätzlich wurde untersucht welche Konzentration des Dipeptids **52** zu unterschiedlichen Verteilungsmustern der Produkte führt.



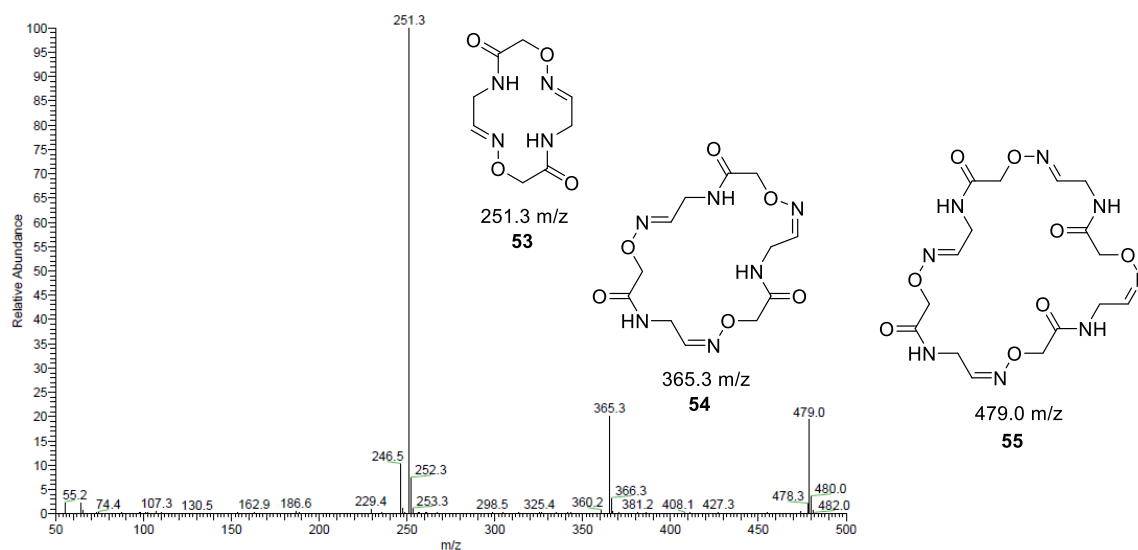


**Schema 3.17** Globale Entschützung von **52** und anschließende, durch Verdünnung und Erhöhung des pH-Werts, eingeleitete, Kondensation zu cyclischen Oligomeren. Hier dargestellt ist das cyclische Tetramer **53**, das als Hauptprodukt identifiziert wurde.

Theoretisch möglich wäre eine direkte intramolekulare Cyclisierung zu einem siebengliedrigen Macrocyclus oder die Bildung von cyclischen Tetrapeptiden **53**, Hexapeptiden oder Octapeptiden nach entsprechender Oligomerisierung des Dipeptids. Untersucht wurden die Konzentrationen 10, 20 und 50 mM (siehe Schema 3.17). Alle drei Reaktionen wurden 2 h bei RT in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O/MeCN (80:20) durchgeführt und anschließend eingefroren und lyophilisiert. Die erhaltenen Rückstände wurden in DMSO<sub>d6</sub> aufgenommen und NMR-spektroskopisch analysiert. Sämtliche <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeigen den gleichen Signalsatz, der von dem symmetrischen Tetrapeptid **53**, welches zu ca. 67% gebildet wird, dominiert wird. Wie in Schema 3.17 verdeutlicht ist, liegt das Hauptprodukt **53** als 14-gliedriger Macrocyclus vor, der durch zwei symmetrische Wasserstoffbrücken zwischen dem NH-Gla und dem Oxim-Stickstoff stabilisiert wird. Diese werden durch einen Temperaturgradienten von -4.60 ppb/K in DMSO charakterisiert.

Weitere Macrocyclen können mittels des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums nicht identifiziert werden. Die Intensität der entsprechenden Signalsätze ist für eine genauere Analyse zu gering. Zur weiteren Charakterisierung der gebildeten Macrocyclen wurden die Proben massenspektrometrisch mittels Elektrospray-Ionisation analysiert. Die Massenspektren zeigen ebenfalls dasselbe Muster. Unter diesen Bedingungen kann das Tetrapeptid **53** als Hauptprodukt bestimmt werden. Die weiteren identifizierten Produkte sind das theoretisch erwartete Hexapeptid **54** sowie das Octapeptid **55** (siehe Abb. 3.14).

Aufgrund der stark unterschiedlichen Messbindungen bei der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie sind die Ergebnisse bedingt miteinander vergleichbar. Es ist ersichtlich, dass in beiden Fällen die Bildung der macrocyclischen Verbindungen nicht konzentrationsabhängig ist und ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet werden kann. Um den Anteil des gebildeten Tetrapeptids zu erhöhen, müsste die Konzentration gesenkt werden, bis neben der Dimerisierung und Cyclisierung keine weiteren intermolekularen Reaktionen mehr beobachtet werden können.



**Abbildung 3.14** Massenspektrum der entstandenen Produkte der reversiblen Kondensationsreaktion. Der Basispeak mit 251.3 stellt das Hauptprodukt **53** dar, die kleineren Peaks (365.3 und 479.0) das Hexapeptid **54** sowie das Octapeptid **55**. Die Verbindungen wurden mit Natrium ionisiert.

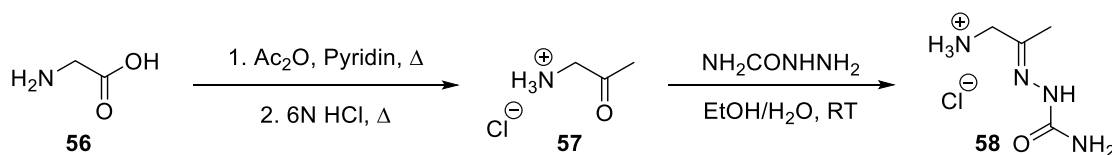
### 3.4 Synthesestrategie von cyclischen Ketoxim-Peptiden

Die Substitution einer C-terminalen Aldehydgruppe gegen ein Keton bietet eine weitere Möglichkeit der reversiblen Macrocyclisierung mit einem N-terminalen Amin und die Lücke zwischen Aldehyd und Carbonsäure wird geschlossen. Im Gegensatz zu Peptidaldehyden ist die NMR-spektroskopische Analyse von Peptidketonen aufgrund der charakteristischen Methylgruppe besser realisierbar. Zusätzlich findet keine Hydratbildung statt, wodurch die Signalintensität konstant bleibt. Dies hat zur Folge, dass die Reaktivität des Carbonyls im Rahmen der Macrocyclisierung geringer wird und mehr Energie in Form von Wärme aufgewendet oder die Nucleophilie desamins erhöht werden muss. Dies kann wie im Beispiel des Tyrocidin A (siehe Kap. 3.1.6) durch ein sekundäres Amin erfolgen oder durch Erhöhung der Nucleophilie mit Hilfe von Hydroxylaminen, die über den Sauerstoff gebunden sind. Die Addition von Hydroxylaminen an Ketone resultiert in thermodynamisch stabilen Ketoximen, welche chemoselektiv gebildet werden. Diese Art der kovalenten Verknüpfung wird häufig in biologischen Systemen zur bioorthogonalen Ligation verwendet.<sup>[285–288]</sup> Eine von BODE et al. weiterentwickelte Ligationmethode ist die  *$\alpha$ -ketoacid-hydroxylamine* (KAHA) Amid-Ligation, in der neben Hydroxylaminen C-terminale  $\alpha$ -Ketosäuren höchst selektiv und mit guten Ausbeuten ligiert werden.<sup>[289–294]</sup>

Cyclische Peptide, die über ein Oxim cyclisiert werden, weisen mit *E* oder *Z* zwei mögliche Konfigurationen des Oxims auf. Die Zuordnung der jeweiligen Konfiguration kann mittels HSQC-Spektroskopie erfolgen, wobei (*E*)-Oxime eine <sup>13</sup>C-Verschiebung von ca. 11.0 ppm und (*Z*)-Oxime von 21.0 ppm aufweisen.<sup>[295]</sup>

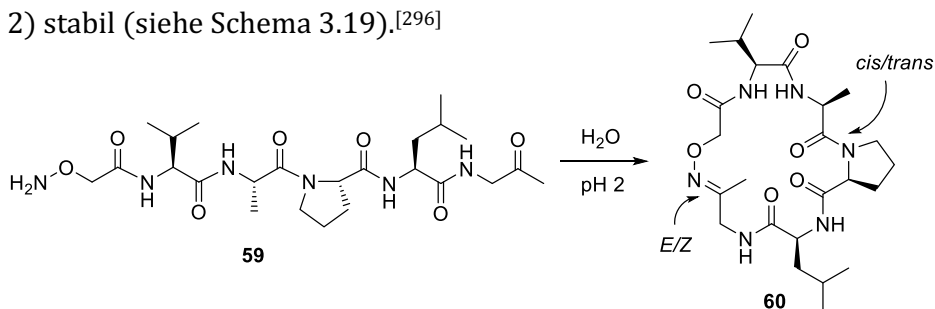
#### 3.4.1 Synthese und Cyclisierung eines C-terminalen Hydroxylamin-Peptidketons

Die Synthese von Peptiden, die C-terminal ein Keton aufweisen, kann nicht ohne weiteres analog der Synthese der Peptidaldehyde durchgeführt werden. Die Übertragung der festphasen-gebundenen Peptidsynthese über ein Oxazolidin-Linker führte zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Basierend auf diesen Resultaten wurde die Peptidsynthese in Lösung von YVONNE GRELL im Rahmen ihrer Bachelorarbeit optimiert und an einem Modellpeptid durchgeführt.<sup>[295,296]</sup> Es wurden zunächst die Synthesen der zwei unnatürlichen Aminosäure-Derivate Glycinon (Kly, Keto-Glycin, **57**) und 2-(Aminooxy)essigsäure (Goly, **50**) durchgeführt. Das Glycinon sollte als C-terminal geschütztes Derivat vorliegen und wurde nach einer modifizierten Vorschrift von HEPWORTH durchgeführt.<sup>[297]</sup> Ausgehend von Glycin (**56**) wird in einer DAKIN-WEST-Reaktion mittels Essigsäureanhydrid in Pyridin das



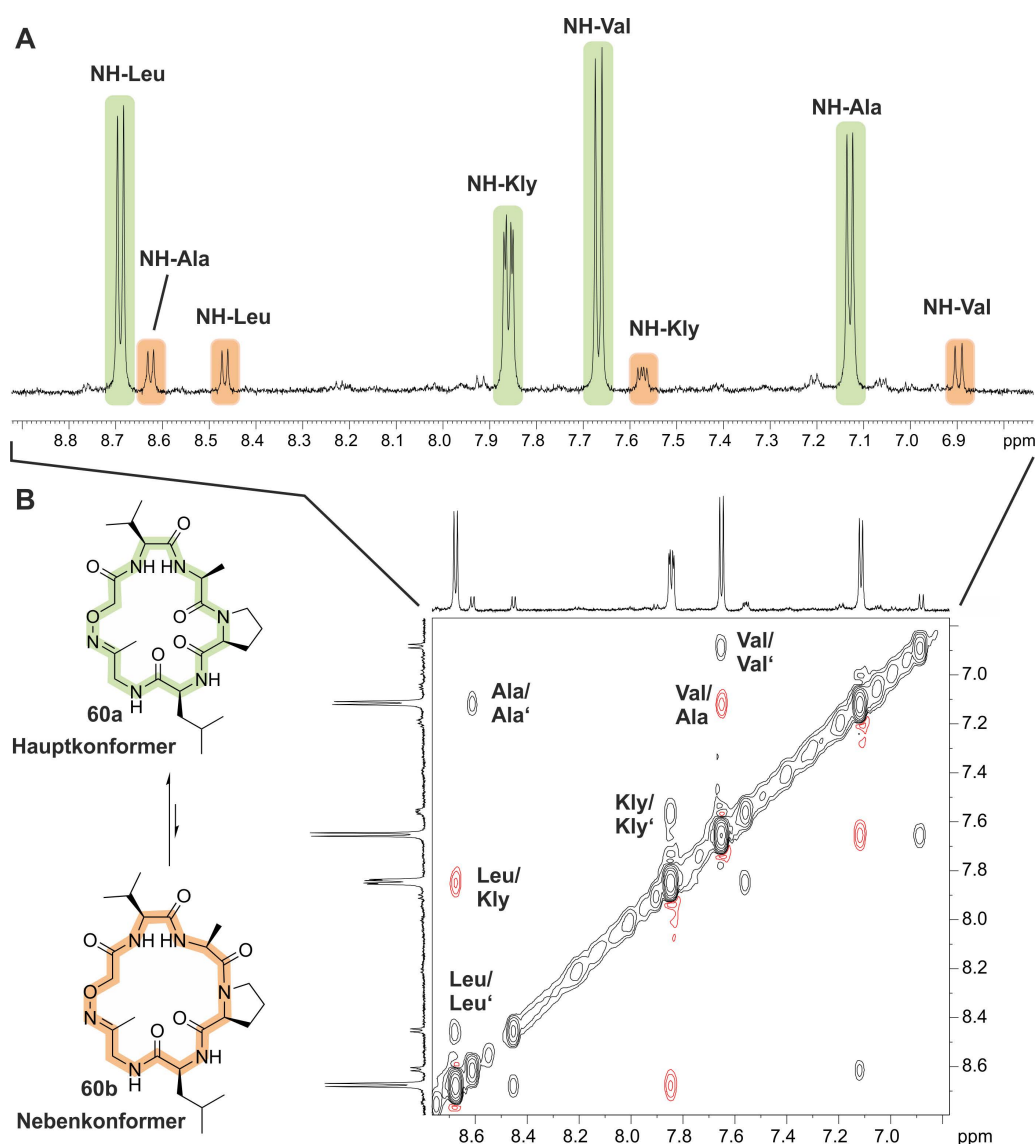
**Schema 3.18** Synthese des Aminosäure-Derivats Glycyl-L-lysine (Kly, 57). In der ersten Stufe wurde eine DAKIN-WEST-Reaktion mit Glycin (56) und anschließender saurer Hydrolyse der Acetyl-Gruppen zu 57 durchgeführt. Abschließend erfolgt eine Schützung des Ketons zum Semicarbazon 58.

zweifach acylierte Aminoaceton erhalten, das säurekatalysiert zum Aminoaceton (57) hydrolysiert und zum Semicarbazon 58 umgesetzt wird (siehe Schema 3.18). Die Aminosäure Boc-Gly-OH (50) wurde wie bereits beschrieben aus Methylbromacetat und *tert*-Butyl-*N*-hydroxylcarbammat synthetisiert (siehe Schema 3.15, S.61). Beginnend mit H-Kly-Semicarbazon wurde in Lösung mittels IBCF-Kupplungsmethoden das Modellhexapeptid H-Gly-Val-Ala-Pro-Leu-Kly-CH<sub>3</sub> (59) synthetisiert, das mit Prolin eine strukturgebende Aminosäure enthält, die für den Ringschluss förderlich sein sollte.<sup>[52,252]</sup> Nach vollständiger Peptidsynthese wurden die terminalen Schutzgruppen säurekatalytisch mit wässriger TFA (95%ig) abgespalten, das Peptid 59 in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der niedrige pH-Wert von ca. 2 reichte bereits für die Cyclisierung aus, sodass das cyclische Ketoxim 60 erhalten wurde. Das cyclische Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt, weist eine konstante Retentionszeit auf und ist unter den gewählten Bedingungen (H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA, pH 2) stabil (siehe Schema 3.19).<sup>[296]</sup>



**Schema 3.19** Cyclisierung des linearen Peptids 59 zum Ketoxim 60 in wässriger Umgebung. Die Reaktion findet bereits bei einem pH-Wert von ca. 2 statt. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Konformation dieses ungewöhnlichen Hexapeptids in Lösung aufgeklärt. Aufgrund des Ketoxims und des Prolins können bis zu vier Isomere gebildet werden.<sup>[296]</sup>

Mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass von den vier möglichen Konformationsisomeren *cis/trans*-Prolin und *E/Z*-Oxim nur zwei gebildet werden. Ein Hauptkonformer 60a, das zu 86% und ein Nebenkonzomer 60b, das zu 14% vorliegt, entstehen. Ein Ausschnitt des NH-Bereichs des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums ist in Abb. 3.15-A gezeigt. Neben dem Hauptsignalsatz ist der kleinere Nebensignalsatz, der bei zunehmender Messtemperatur geringer wird, zu erkennen. Die beiden gebildeten Konformere 60a und b können, aufgrund der schnellen Gleichgewichtseinstellung zwischen den Verbindungen, präparativ nicht voneinander getrennt werden. Dies kann durch Austauschsignale im ROESY-Spektrum bestätigt werden (Abb. 3.15-B).<sup>[296]</sup>



**Abbildung 3.15 A)** (600 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>) Bereich der NH-Amid-Signale des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von Peptid **60**. Gezeigt ist das Gleichgewicht zwischen beiden Konformeren. Mit 86% liegt das Hauptkonformer **60a** (grün) und mit 14% das Nebenkonzomer **60b** (orange) vor. Den Unterschied in der Konformation stellt die Prolin-Amidbindung dar, die im Hauptkonformer *trans* und im Nebensignalsatz *cis* vorliegt. Die *E/Z*-Isomerie des Ketoxims bleibt unverändert. **B)** Zuordnung der NH-Signale des Nebenkonzomers **60b** durch chemische Austauschsignale mit negativer Phase (schwarz) im ROESY-Spektrum. Die roten Kreuzsignale sind ROE-Kontakte und weisen eine positive Phase auf. Deutlich zu erkennen sind die starken NH-NH-Kontakte des Val-Ala und Leu-Kly des Hauptkonformers **60a**.<sup>[296]</sup>

Mittels HSQC-Spektroskopie konnten das Hauptkonformer **60a** sowie das Nebenkonzomer **60b** eindeutig bestimmt und zugeordnet werden. Die Bestimmung der *E/Z*-Isomerie des Oxims wurde durch den Vergleich von HSQC-Spektren von (*E*)- und (*Z*)-Oximen, die sich deutlich in ihrer chemischen Verschiebung der Methyl-Gruppe unterscheiden, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Fällen das (*E*)-Oxim vorliegt. Die *cis/trans*-Prolin Konformation wurde, wie bereits beschrieben, anhand der β-CH<sub>2</sub> und γ-CH<sub>2</sub> Verschiebung im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ermittelt. Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass im Hauptkonformer **60a** die Prolin-Amidbindung als *trans*-Rotamer vorliegt und im

Nebenkonomer als *cis*-Rotamer. In Abbildung 3.15-B ist ein Ausschnitt des ROESY-Spektrums abgebildet, das den NH/NH-Bereich der Peptide darstellt. Zu erkennen sind in rot die NH/NH-ROE-Kontakte des Hauptkonformers **60a**, die essentielle Informationen über die Struktur liefern. Es treten Kontakte zwischen NH-Leu/NH-Kly und NH-Val/NH-Ala auf, woraus geschlossen werden kann, dass diese Aminosäuren sich in den Ecken der *turns* befinden müssen. Kreuzsignale mit inverser Phase sind in schwarz dargestellt und entstehen durch chemische Austauschreaktionen. In diesem Fall kann die schnelle Umwandlung zwischen Hauptkonformer und Nebenkonomer beobachtet werden. Die Kreuzsignale ermöglichen eine direkte Zuordnung des Nebenkonomers **60a** sowie die Berechnung der Energiebarriere der Konformationsänderung, die auf den Arbeiten von JEENER und PERRIN basieren.<sup>[298,299]</sup> Für die Berechnung der Gleichgewichtskonstante des idealisierten Falls, in dem die Transformation zweier Spezies, die in gleicher Konzentration vorliegen, betrachtet wird, gilt Formel 3.1.

$$k = \frac{1}{t_m} \ln \left( \frac{r+1}{r-1} \right) \quad \text{mit } r = \frac{I_{AA} + I_{BB}}{I_{AB} + I_{BA}}$$

**Formel 3.1** Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten  $k$  der Transformation nach einer Gleichung von PERRIN et al. für den Fall eines äquimolaren Stoffmengenverhältnisses.<sup>[298,299]</sup> Die Mischzeit  $t_m$  beträgt 0.3 s und das Intensitäts-Verhältnis  $r$  kann anhand der aus dem ROESY-Spektrum ermittelten Intensitäten bestimmt werden.

In der Transformation zwischen Hauptkonformer und Nebenkonomer liegen keine äquimolaren Mengen der Verbindungen vor. Die vereinfachte Berechnung des Verhältnisses  $r$  aus Formel 3.1 kann nicht angewendet, es muss der entsprechende Stoffmengenanteil berücksichtigt werden. Wie bereits angegeben, liegt dieser für das Hauptkonformer bei  $X_A = 0.86$  und bei  $X_B = 0.14$  für das Nebenkonomer. Nach der erweiterten Formel 3.2 kann mit den ermittelten Intensitäten der Kreuz- sowie Diagonalsignale aus dem ROESY-Spektrums und den Stoffmengenanteilen  $X_A$  und  $X_B$  das Intensitäts-Verhältnis  $r$  berechnet werden.

$$r = 4X_A X_B \frac{(I_{AA} + I_{BB})}{(I_{AB} + I_{BA})} - (X_A - X_B)^2 = 0.4816 \frac{1.15}{0.04} - 0.5185 = 13.3275$$

**Formel 3.2** Berechnung des Intensitäts-Verhältnisses  $r$  für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante  $k$  im Fall eines nicht äquimolaren Stoffmengenverhältnisses. Die einbezogenen Intensitäten wurden aus dem ROESY-Spektrum ermittelt und sind im Anhang angegeben. Der Stoffmengenanteil des Hauptkonformers beträgt  $X_A = 0.86$  und für das Nebenkonomer  $X_B = 0.14$ .

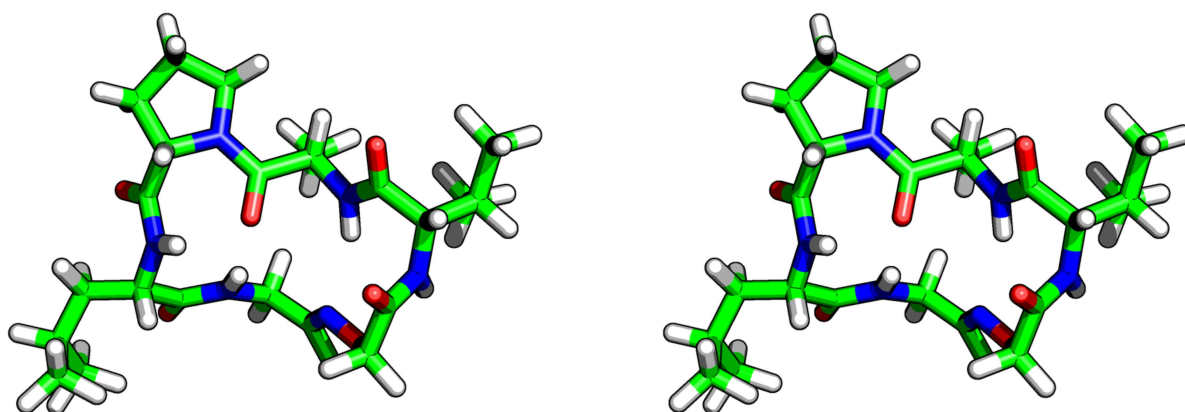
Mit einem Intensitätsverhältnis  $r = 13.3275$  und einer Mischzeit während des ROESY-Experiments von 0.3 s kann die Gleichgewichtskonstante  $k$  mit Formel 3.1 berechnet werden. Es ergibt sich eine Konstante  $k = 0.5012 \text{ s}^{-1}$ , mit der eine Aktivierungsbarriere der Umwandlung auf Basis von Formel 3.3 ermittelt werden kann.

$$\Delta G = T \cdot 0.0191 \left( 10.32 + \log \left( \frac{T}{k} \right) \right) = 75.05 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} = 17.95 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

**Formel 3.3** Ermittlung der Aktivierungsbarriere der *cis/trans*-Isomerisierung der Prolin-Amidbindung im cyclischen Peptid **60**. Die Temperatur  $T = 300 \text{ K}$  sowie die Konstante  $k = 0.5012 \text{ s}^{-1}$  werden benötigt.

Mit einer Aktivierungsbarriere von  $75 \text{ kJ/mol}$  liegt der Prozess verglichen mit der *cis/trans*-Prolin Isomerisierungsbarriere von ca.  $75$  bis  $85 \text{ kJ/mol}$  im erwarteten Bereich.<sup>[300–302]</sup>

Anhand der vollständigen Zuordnung der 2D-NMR-Spektren und Auswertung der temperaturabhängigen NH-Verschiebungen wird ein gutes Bild des cyclischen Peptids erhalten, das mittels HyperChem® in einer energieminierten Durchschnittskonformation graphisch dargestellt werden kann. In Abbildung 3.16 ist das Hauptkonformer **60a** als Stereobild aufgeführt.



**Abbildung 3.16** Energieminimierte Konformation des Hauptkonformers **60a** des cyclischen Ketoxim-Peptids **60** auf Basis der NMR-spektroskopischen Daten mittels Berechnung über HyperChem®. Die Darstellung erfolgt als Stereobild, das durch Anwendung des Kreuzblicks dreidimensional erscheint.

### **3.5 Synthesestrategie von N-terminalen Peptidaldehyden**

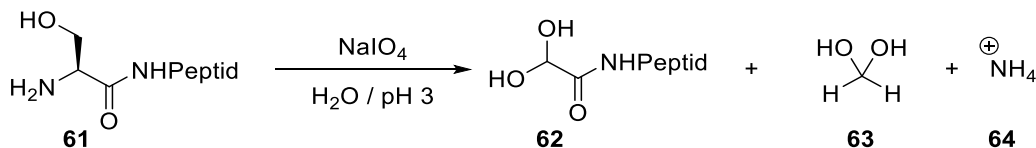
Der synthetisch schnellste und simpelste Zugang zu Peptidaldehyden ist die oxidative Periodat-Spaltung von 1,2-Aminoalkoholen, wie sie in Serin und Threonin auftreten. Die Reaktion basiert auf den Arbeiten von MALAPRADE und CRIEGEE über die Glykolspaltung.<sup>[303,304]</sup> Durch Spaltung dieser funktionellen Gruppe, die in natürlichen Peptiden nur N-terminal auftritt, können selektiv N-terminale Peptidaldehyde gebildet werden. In diesem besonderen Fall werden Glyoxamide gebildet, die eine weitaus höhere Reaktivität gegenüber Nucleophilen aufweisen als Aldehyde und in wässriger Lösung bevorzugt Hydrate bilden.<sup>[305]</sup> Die chemische Verschiebung dieser Hydrate liegt beim Proton bei ca. 5.5 ppm und im Fall des Kohlenstoffs bei ca. 90 ppm.<sup>[286,287]</sup> Der hohe Anteil an Hydrat im Gleichgewicht wird beispielsweise im Design von HIV-1 Protease Inhibitoren verwendet.<sup>[306]</sup> Glyoxamide werden vor allem in biologischen Systemen zur Biokonjugation genutzt, um peptidbasierte Micro- und Nanosysteme zu synthetisieren.<sup>[307]</sup> Im Rahmen einer NMR-Studie haben BARANY et al. die Addition von Guanidinium-Chlorid und Harnstoff an Glyoxamid-Peptide in Wasser bei einem pH-Wert von 4.6 untersucht. Es konnte eine partielle Bildung des entsprechenden Halbaminal beobachtet werden. Ein vollständiger Umsatz erfolgte erst bei Konzentrationen von über 6 M.<sup>[286]</sup> Dies zeigt die relativ geringe Reaktivität gegenüber Nucleophilen in wässriger Umgebung. Eine Möglichkeit der Aktivierung ist die katalytische Zugabe von Anilin oder Morpholin, wodurch die Bildung von Oximen, Hydrazonen oder Thiazolen erfolgen kann.<sup>[308-311]</sup> Vorteilhaft an dieser Methode ist die einfache Zugänglichkeit der funktionellen Gruppe, da nur N-terminale Serin oder Threonin-Peptide benötigt werden, die häufig in der Natur anzutreffen oder einfach zu synthetisieren sind.

#### **3.5.1 Synthese von N-terminalen Peptidaldehyden**

Die Synthese erfolgte durch Festphasenpeptidsynthese mittels eines 2-CTC-Harz, das mit Glycin als erste Aminosäure beladen wurde. Synthetisiert wurden zwei Modellpeptide, mit welchen zunächst die Glyoxamid Bildung untersucht und anschließend die intramolekulare Cyclisierung solcher Peptide über eine Lysin-Seitenkette analysiert wurde. Das Modellpeptid **61** mit Ser-Gly-Phe-Ala-Gly wurde nach semi-präparativer Aufreinigung in einem wässrigen Phosphat-Puffer bei pH 3 gelöst und anschließend mit Natriumperiodat (2.0 eq) versetzt (siehe Schema 3.20). Der geringe pH-Wert erhöht die Löslichkeit des Periodats und beschleunigt die Reaktion. Die eintretende Periodat-Spaltung verläuft schnell und kann mittels NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Charakteristisch ist dabei eine starke Veränderung im NH-Bereich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, bis hin zur dritten N-terminalen

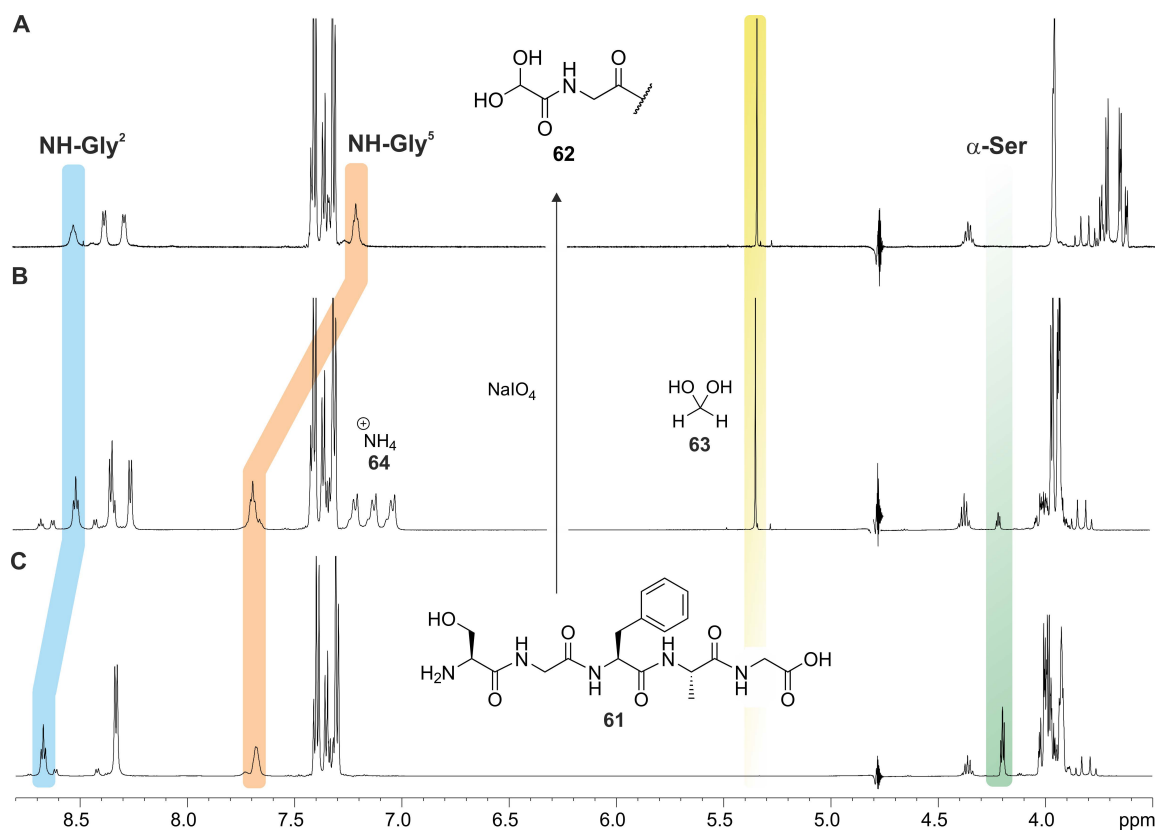


Aminosäure Phenylalanin sowie das Verschwinden der  $\alpha$ -Ser- und  $\beta$ -Ser-Protonen. Die Bildung des Glyoxamid-Hydrats **62** und des Iminium-Ions des Formaldehyds, das durch den niedrigen pH-Wert hydrolysiert wird und Ammoniak als Ammonium-Ion (**64**) sowie Formaldehyd-Hydrat (**63**) freisetzt, kann beobachtet und analysiert werden.



**Schema 3.20** Synthese des Hydrats **62** eines Glyoxamid-Peptids ausgehend vom N-terminalen 1,2-Aminoalkohol-Peptid **61**. Mittels Periodat erfolgt in wässriger Lösung eine Spaltung von Serin oder Threonin, wodurch ein Glyoxamid freigesetzt wird, das weiter zum Hydrat **62** reagiert. Als Nebenprodukte entstehen Formaldehyd-Hydrat **63** sowie Ammoniak, das als Ammonium-Ion **64** vorliegt.

Die Spaltung des 1,2-Aminoalkohols **61** und Freisetzung des Glyoxamids, das aufgrund des geringen pH-Werts direkt zum Hydrat **62** abreagiert, ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Durch Erhöhung des pH-Werts auf 5.5 wurde die Reaktivität des Hydrats analysiert und das Verschwinden des Ammonium-Ions aufgrund des H/D-Austauschs beobachtet.

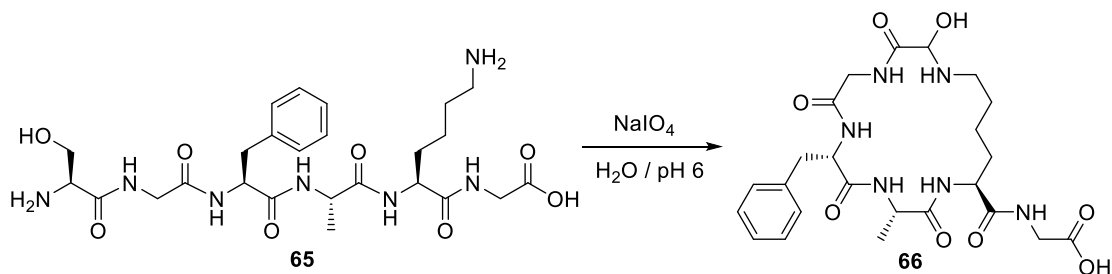


**Abbildung 3.17** (600 MHz, 300 K, Phosphat-Puffer/ $\text{D}_2\text{O}$  5:1, pH 3) Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Modellreaktion von **61**. Gezeigt ist der Bereich zwischen 8.80 und 3.50 ppm. Es fehlen die  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -Protonen des Phe sowie die Methylgruppe des Ala. **A)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Startverbindung **61**. Zu erkennen sind die noch vorhandenen  $\alpha$ -Ser-Protonen (grün), das NH-Proton des Gly<sup>2</sup> (blau), welches während der Reaktion ebenfalls stark beeinflusst wird, das C-terminale NH-Gly (rot) sowie das noch nicht gebildete Hydrat in gelb. **B)** Zugabe des Natriumperiodats, wodurch die oxidative Spaltung eintritt und neue Signalsätze entstehen bzw. kleiner werden. **C)** Vollständige Reaktion zu **62** und Erhöhung des pH-Werts, woraus lediglich eine Verschiebung der C-terminalen Glycine-Signale resultiert.

Ohne die Anwesenheit von geeigneten Nucleophilen bleibt das Hydrat stabil. Lediglich die Verschiebung der Signale des C-terminalen Glycins ändert sich in Richtung Hochfeld (siehe Abb. 3.17-C). Durch die Zugabe von Alanin wurde die Reaktivität gegenüber Nucleophilen innerhalb eines intermolekularen Angriffs an das Hydrat bei pH-Werten von 5.5 und 7 untersucht. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität bzw. die Nucleophilie nicht ausreicht, um einen nucleophilen Angriff stattfinden zu lassen. Das Integral des Hydrats bleibt konstant und es wurde keine Bildung eines neuen Signalsatzes im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum beobachtet.

### 3.5.2 Cyclisierung von N-terminalen Peptidaldehyden

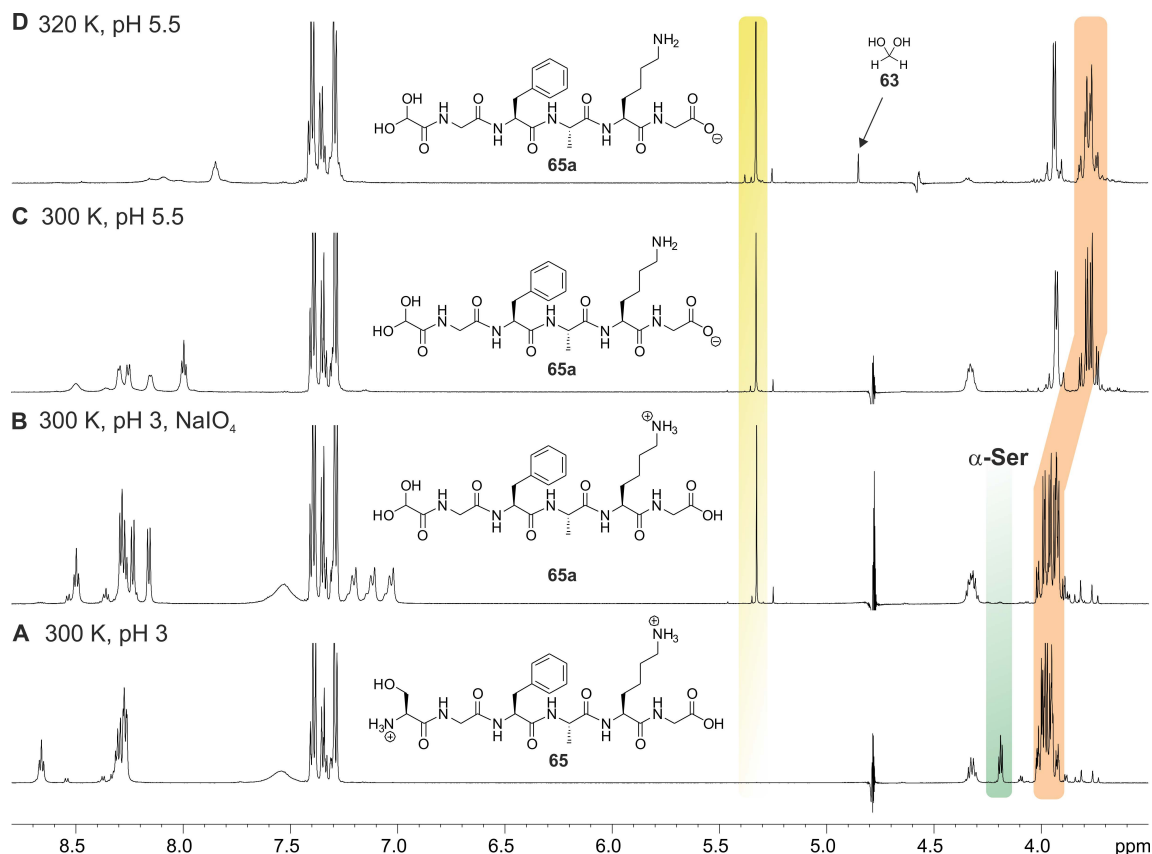
Basierend auf den Experimenten zur oxidativen Spaltung von N-terminalen Serin- oder Threonin-Peptiden und den Untersuchungen zur intermolekularen Addition von Nucleophilen an Glyoxamid-Hydrat-Peptide wurde das Modellpeptid **61** um ein Lysin erweitert. Die Seitenkette des zusätzlichen Lysins sollte in der Analyse der intramolekularen Cyclisierung verwendet werden. Das entsprechende zweite Modellpeptid dieser Reihe, ein Hexapeptid, besteht aus Ser-Gly-Phe-Ala-Lys-Gly **65**, wurde analog synthetisiert und unter gleichen Bedingungen gelöst, NMR-spektroskopisch untersucht und oxidativ mit Periodat gespalten.



**Schema 3.21** N-terminale Spaltung des 1,2-Aminoalkohols **65** zum entsprechenden Glyoxamid, das direkt intramolekular über die Seitenkette des Lysins, zum entsprechenden Imin cyclisiert werden soll. Abgebildet ist die Verbindung als Halbaminal **66**, das analog zum Aldehyd/Hydrat entstehen sollte.

Durch die Cyclisierung der Lysin-Seitenkette mit dem Glyoxamid/Hydrat **65a** sollte sich ein cyclisches Peptid **66** bilden, das sich in der Anzahl der Atome isoster zu einem Hexapeptid verhält und demnach eine hohe Cyclisierungstendenz aufweisen sollte (siehe Schema. 3.21). Die oxidative Spaltung, die analog dem Modellpeptid **61** verläuft, konnte NMR-spektroskopisch analysiert werden. Nach vollständiger Reaktion wurde erneut der pH-Wert auf 5.5 erhöht. Es bildete sich kein neuer Signalsatz im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Eine Temperaturerhöhung von 300 K auf 320 K führte ebenfalls nicht zur gewünschten Macrocyclisierung. Ein Signal, das durch die temperaturabhängige Verschiebungsänderung

im Bereich des unterdrückten Wassersignals bei 4.85 ppm sichtbar wird, kann dem Formaldehyd-Hydrat (**63**) zugeordnet werden (siehe Abb. 3.18). Es wird ersichtlich, dass keine nucleophile Addition von Aminen an das *in-situ* gebildete Glyoxamid unter den gegebenen Bedingungen realisierbar ist. Als Hauptgrund wird die Stabilität des Hydrats **65a**, die eine Substitution durch primäre Amine erschwert, vermutet.



**Abbildung 3.18** (600 MHz, 300 K, Phosphat-Puffer/D<sub>2</sub>O 5:1, pH 3) Bereich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums der Modellreaktion von **65**. Gezeigt ist der Bereich zwischen 8.80 und 3.50 ppm, es fehlen die β-CH<sub>2</sub>-Protonen des Phe sowie die Methylgruppe des Ala. **A)** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Rohpeptids vor Zugabe von Natriumperiodat. **B)** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nach Zugabe des NaIO<sub>4</sub> und vollständiger Reaktion zum Hydrat **65a**. Zu erkennen ist die Reaktion an der Hydrat-Bildung (gelb) und dem Verschwinden des αH-Ser (grün). **C)** Erhöhung des pH-Werts der Probelösung auf 5.5 zur partiellen Deprotonierung des Amins. Erwartet wurde eine nucleophile Substitution, die zum Ringschluss führen sollte. Zu beobachten ist lediglich eine Verbreiterung der NH-Signale und die Änderung der chemischen Verschiebung des terminalen Glycins (rot), welches deprotoniert wird. **D)** Eine Erhöhung der Temperatur auf 320 K bewirkt keine Änderung der Struktur.

Trotz des einfachen Zugangs dieser Peptidaldehyde ist aufgrund der geringen Reaktivität in wässrigem Phosphat-Puffer der entsprechenden Hydrate und der zusätzlichen Veränderung der nativen Peptidsequenz eine Anwendung im Rahmen der Totalsynthese von Lassozeptiden nicht gegeben. Im folgenden Kapitel wird die Synthesestrategie über Seitenketten-Peptidaldehyde näher betrachtet und Syntheserouten dieser Peptidklasse vorgestellt und analysiert.

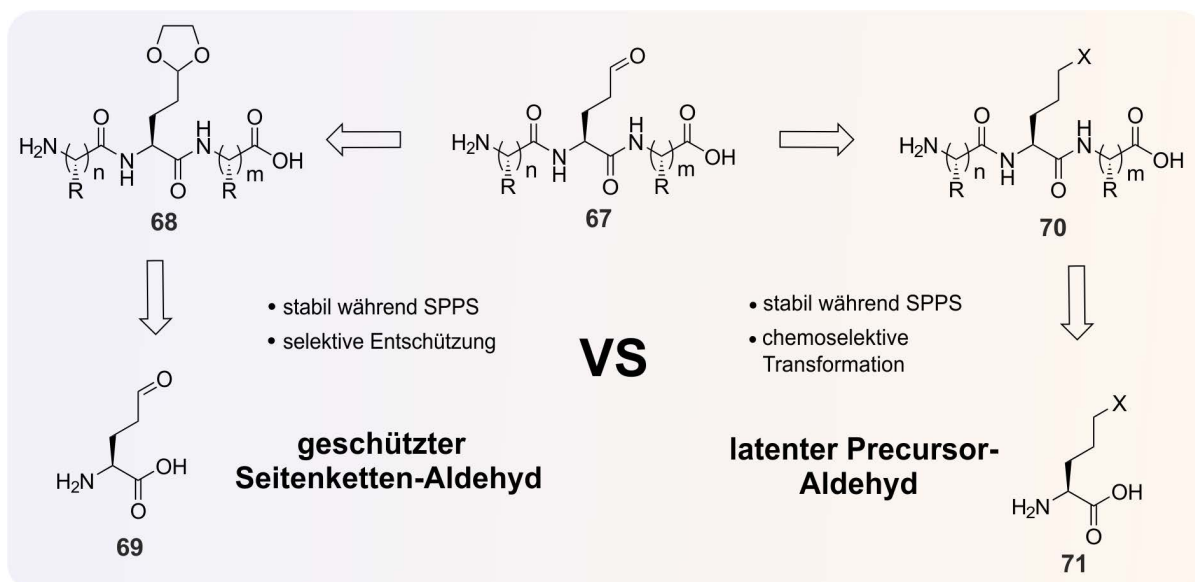
### 3.6 Synthese und Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden

Für die Einführung/Synthese eines Aldehyds in die Seitenkette eines Peptids sind unterschiedliche Methoden literaturbekannt. Im Rahmen der Peptidbiosynthese können Seitenketten-Aldehyde mit Hilfe von Enzymen wie dem *Formylglycin-generierenden Enzym* (FGE) post-translational synthetisiert werden.<sup>[312–315]</sup> Die chemische Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden ist in der Literatur wenig beschrieben und oft nur durch aufwendige Syntheseschritte realisierbar.<sup>[235,316,317]</sup> In dieser Arbeit werden zwei komplementäre Synthesestrategien durchgeführt, analysiert und deren Vor- und Nachteile miteinander verglichen.

#### 3.6.1 Synthesestrategie von Seitenketten-Peptidaldehyden

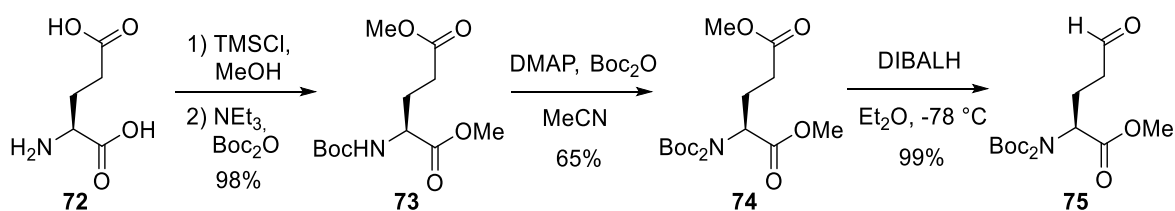
Aufgrund der Reaktionsbedingungen während der Festphasenpeptidsynthese kann der Aminoaldehyd nicht ungeschützt in der Synthese eingesetzt werden. Es muss eine geeignete Schutzgruppe oder ein Precursor gefunden werden, die nach Abspaltung des Peptids selektiv in den Seitenketten-Aldehyd überführt werden können. Bei der Wahl einer geeigneten Strategie sollte die Stabilität der entsprechenden funktionellen Gruppe so hoch sein, dass sie die Peptidsynthese und die Abspaltung mit Trifluoressigsäure toleriert und sich anschließend chemoselektiv zum Aldehyd umsetzen lässt. Geeignete Schutzgruppen für einen aliphatischen Aldehyd **69** sind ausreichend vorhanden. Es muss zwischen offenkettigen und cyclischen Acetalen **68**, Semicarbazonen, Hydrazonen und Dithianen entschieden werden.<sup>[318]</sup>

Passende Precursor wie **70** bzw. **71**, die post-synthetisch zum Aldehyd umgesetzt werden können, sind beispielsweise Olefine und Diole, die chemoselektiv zum Aldehyd abreagieren. Alkohole bzw. Carbonsäure-Derivate, die durch geeignete Oxidations- oder Reduktionsreaktionen in Aldehyde überführt werden können, weisen eine zu hohe natürliche Häufigkeit in Peptiden auf, wodurch sie als selektive Precursor keine Anwendung finden. Beide Syntheserouten haben Vor- und Nachteile in der Durchführung, die vor allem in der Synthese von Fmoc-geschützten Aminosäure-Bausteinen, in der nachfolgenden Festphasenpeptidsynthese und –entscheidend– in der Abspaltung der Peptide vom Trägermaterial auftreten. In Abbildung 3.19 ist eine retrosynthetische Zerlegung eines Seitenketten-Peptidaldehyds **67** über beide Syntheserouten zusammengefasst dargestellt. Der linke Reaktionspfad stellt die Synthese eines geschützten Seitenkettenaldehyds als Acetal **68** und der rechte die Route über einen latenten Precursor **70** dar.



**Abbildung 3.19** Darstellung der Synthesemöglichkeiten von Seitenketten-Peptidaldehyden **67**. Die Syntheseroute links beschreibt retrosynthetisch die Verwendung von Carbonyl-Schutzgruppen **68** basierend auf einem Seitenketten-Aldehyd **69**. Die Schutzgruppe muss während der Synthese stabil und nach der Synthese wieder einfach sowie selektiv entfernbar sein. Die Retrosynthese rechts zerlegt das Peptid in den Precursor **71**, der ebenfalls während der Synthese zu **70** stabil und nach der Peptidsynthese leicht in die Aldehyd-Funktion transformierbar sein muss.

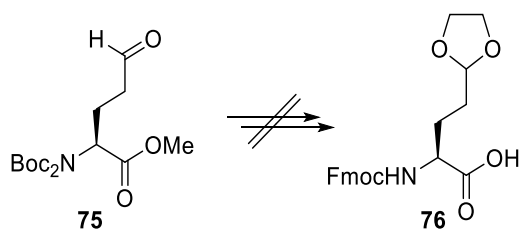
Beide Syntheserouten wurden durchgeführt und auf ihre Anwendbarkeit im Rahmen der Festphasenpeptidsynthese, Ausbeute und Reinheit der Peptide hin analysiert. Aufgrund der hohen Komplexität der Peptide wurde an erster Stelle untersucht, wie chemoselektiv und quantitativ die Umsetzungen erfolgen. Es sollte beachtet werden, dass die chemoselektive Freisetzung des Aldehyds in Wasser erfolgen muss, um die nachfolgende Cyclisierung nicht unter denaturierenden Bedingungen durchführen zu müssen. Die Synthese eines Seitenketten-Aldehyds **75** der Glutaminsäure **72** ist bereits bekannt und wurde als Ausgangspunkt für diese Arbeit genutzt (siehe Schema 3.22).<sup>[319,320]</sup>



**Schema 3.22** Synthese des Glutaminsäure-Aldehyds **75** ausgehend von L-Glutaminsäure in drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 63%.<sup>[319,320]</sup> Der Aldehyd **75** dient als Edukt für weitere Synthesen.

In ersten Studien wurde versucht den Aldehyd **75** als cyclisches Acetal zu schützen, die Schutzgruppen-Strategie auf Fmoc-Strategie zu ändern und den Fmoc-geschützten, in der Festphasensynthese einsetzbaren Baustein **76** zu erhalten. Die Synthese konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Daher wurden eine direkte Schützung des Aldehyds und die Synthese entsprechender Peptide zunächst nicht weiter verfolgt (siehe Schema 3.23).

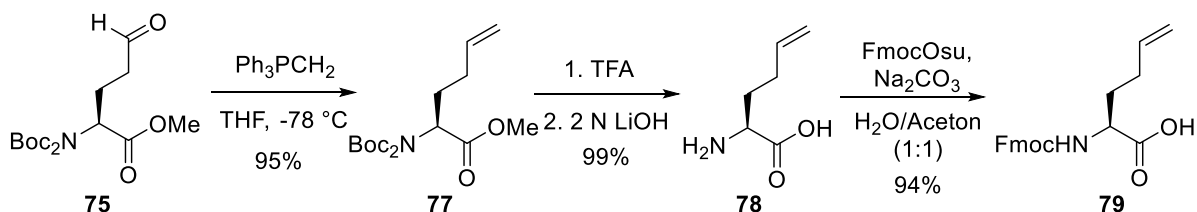
Im folgenden Kapitel wird auf die vielversprechendere Precursor-basierte Peptidsynthese eingegangen.



**Schema 3.23** Versuchte Synthese von Acetal-geschützten Seitenketten-Aldehyd-Aminosäuren in Peptiden. Besonders problematisch erwies sich in diesem Fall die selektive Umschüttung zu einem in der Festphasensynthese verwendbaren Fmoc-Baustein **76**.

### 3.6.2 Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Olefine

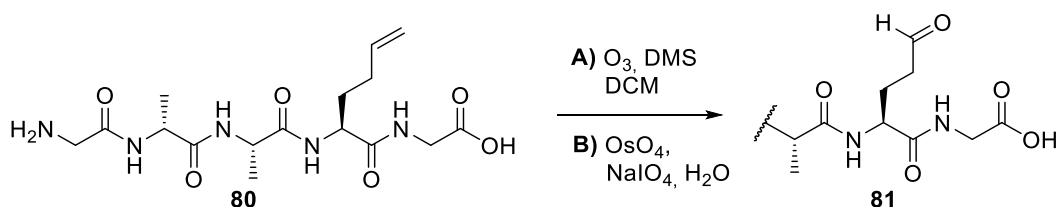
Zur Darstellung von latenten Seitenketten-Peptidaldehyden wurde die Synthese eines terminalen Olefins in der Seitenkette durchgeführt. Dieses hält den Bedingungen der Festphasensynthese stand und kann post-synthetisch durch unterschiedliche Reaktionen in einen Aldehyd überführt werden. Die Herstellung solcher Aminosäure-Derivate kann mit dem bereits synthetisierten Aldehyd **75** begonnen werden. Ausgehend vom geschützten Glutaminsäure-Aldehyd **75** wurde über eine WITTIG-Reaktion das Olefin **77** eingeführt, der Methylester alkalisch hydrolysiert und die Boc-Schutzgruppe säurekatalytisch zu **78** abgespalten. Unter basischen Bedingungen wurde abschließend eine Fmoc-Schutzgruppe eingeführt. Es wird Fmoc-Homoallylglycin-OH (**79**), als ein in der Festphasensynthese einsetzbarer, stabiler und im Multigramm-Maßstab synthetisierter Baustein, erhalten (siehe Schema 3.24).



**Schema 3.24** Synthesesequenz der unnatürlichen Aminosäure Homoallylglycin **79** ausgehend von *N,N*-Diboc-Glutaminsäure(CHO)-OMe (**75**) über drei Stufen in 88% Ausbeute. Schlüsselschritt ist die WITTIG-Reaktion, anschließend erfolgt die Umschüttung für die Festphasensynthese.

Der für die Festphasensynthese geeignete Aminosäurebaustein **79** konnte problemlos in Modellpeptide oder Microcin J25 Derivate eingebaut werden. Die Abspaltung der entsprechenden Peptide erfolgt unter milderen Bedingungen bei 0 °C mit wässriger TFA (95%ig). Nach Aufarbeitung und Reinigung der Peptide muss eine bioorthogonale Reaktion durchgeführt werden, die alle restlichen Seitenketten des Peptids chemisch nicht modifiziert, sondern explizit das terminale Olefin anspricht und in den Seitenketten-Aldehyd überführt.

Dies kann mittels einer Ozonolyse des Peptids unter geeigneten Bedingungen oder über eine Bishydroxylierung mit anschließender Periodat-Spaltung im Rahmen einer LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation erreicht werden (siehe Schema 3.25). Bei der Ozonolyse, die 1905 von HARRIES entwickelt und deren Mechanismus von CRIEGEE in Marburg aufgeklärt wurde, wird mittels eines Ozongenerators *in-situ* gebildetes Ozon in die Substrat-Lösung eingeleitet.<sup>[321,322]</sup> Die Reaktion gilt als beendet, wenn sich die Lösung durch überschüssiges Ozon bläulich färbt. Das gebildete Sekundärozonid kann reduktiv oder oxidativ aufgearbeitet werden; eine Aufarbeitung mit Dimethylsulfid oder Triphenylphosphan ergibt die gewünschte Carbonyl-Verbindung.<sup>[321,322]</sup> Die Ozonolyse findet bereits in der Synthese von Peptidaldehyden Anwendung, wobei auf die Sequenz des C-terminalen Peptidaldehyds geachtet werden muss, da oxidationsempfindliche Aminosäuren wie Tyrosin, Histidin oder Tryptophan den Reaktionsbedingungen nicht standhalten.<sup>[205,231–233,323]</sup>

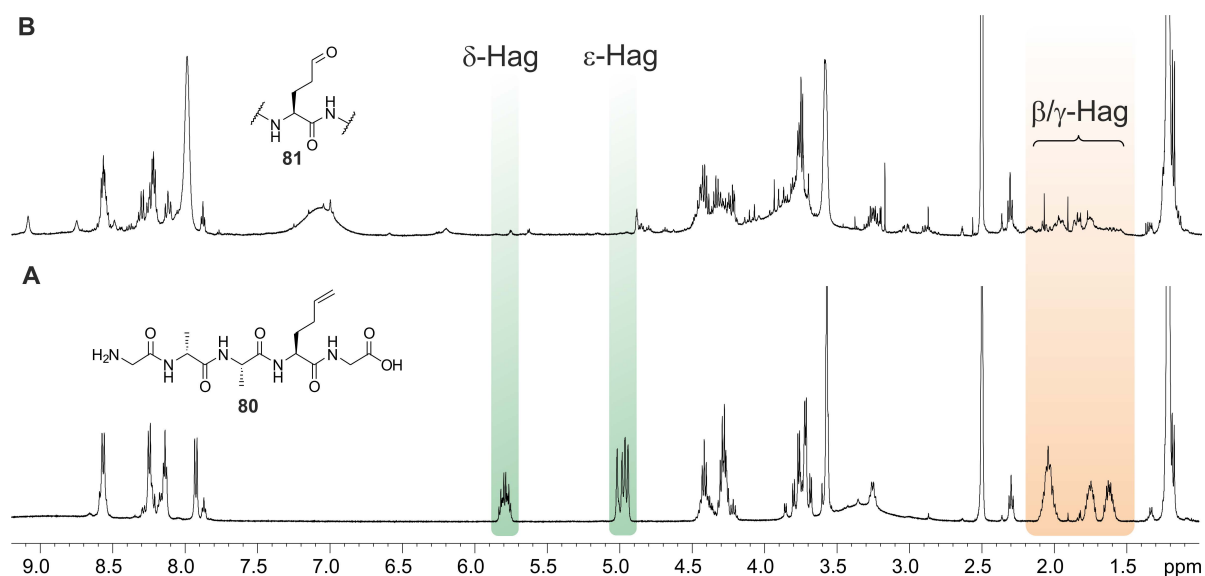


**Schema 3.25** Oxidationsmöglichkeiten der terminalen Doppelbindung von **80** zum entsprechenden Seitenketten-Aldehyd **81**. Die Syntheseroute **A** beschreibt die Ozonolyse des Peptids, die aber bei Anwesenheit von aktivierten Aromaten wie Tyrosin zu Problemen führt. Einen weiteren Weg stellt die LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation in Syntheseroute **B** dar, die den Vorteil hat, dass sie in wässriger Umgebung durchführbar ist.

Nach Synthese des Modellpeptids H-Gly-ala-Ala-Hag-Gly-OH (**80**) wurde die Ozonolyse unter standardisierten Bedingungen mit DCM als Lösungsmittel bei  $-78^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Anhand der fehlenden, olefinischen Signale (grün) im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum kann gezeigt werden, dass die Reaktion funktioniert (siehe Abb. 3.20). Es entsteht eine Vielzahl an Nebenprodukten und eine semi-präparative Aufreinigung konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden verschiedene Lösungsmittel, Reduktionsmittel und Temperaturen verwendet (siehe Tabelle 3.1). Die Reaktion führte jedoch nicht selektiv zum Seitenkettenaldehyd **81**.

**Tabelle 3.1** Bedingungen für die Ozonolysereaktionen des Olefinpeptids **80**. Übersicht der verwendeten Lösungsmittel, Reduktionsmittel, Temperaturen sowie Reaktionszeiten. \* = die Ausbeuten sind nicht bestimmbar.

Eintrag	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit [min]	Ausbeute
1	PPh <sub>3</sub>	DCM	$-78^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$	60	*
2	Thioharnstoff	DCM	$-78^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$	60	*
3	Thioharnstoff	MeOH	$-78^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$	60	*
4	Dimethylsulfid	Aceton	$0^{\circ}\text{C}$	60	*

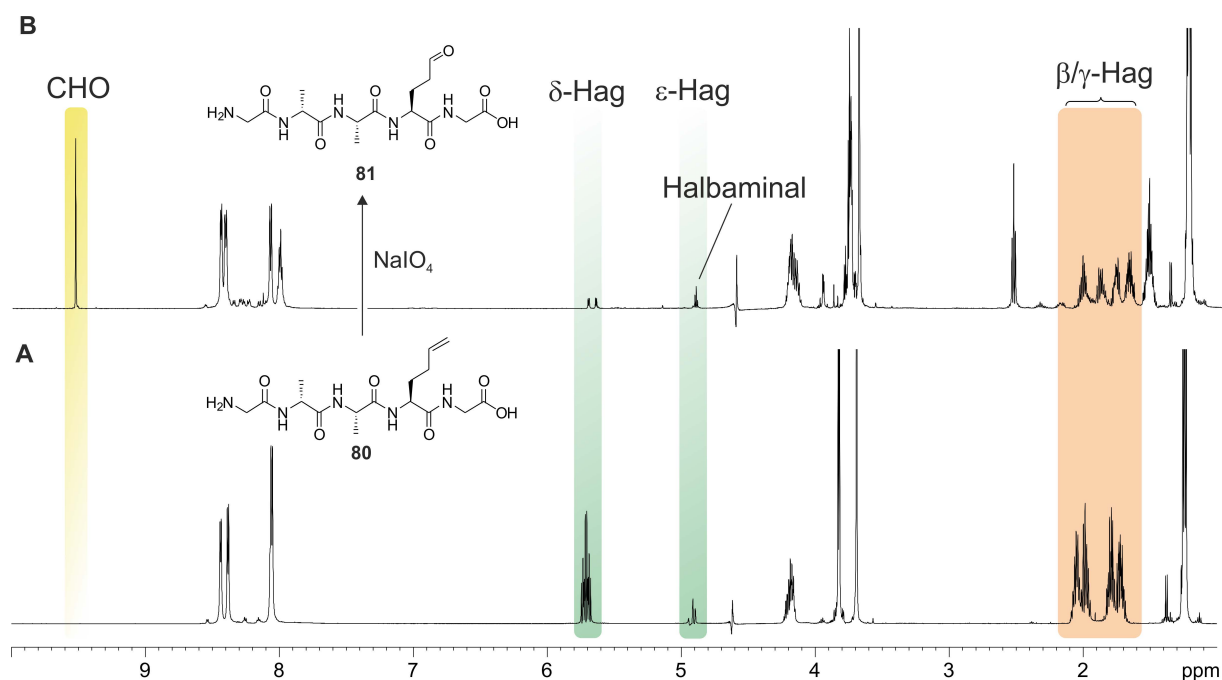


**Abbildung 3.20:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K). **A)** Eduktspektrum des Olefinpeptids **80** vor der Ozonolyse. **B)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Rohpeptids **81** nach der Ozonolyse. Zu erkennen ist, dass die Signale des terminalen Olefins (grün) bei 5.0 und 5.8 ppm im Eduktspektrum, nach der Reaktion in **B)** nicht mehr vorhanden sind. Das Rohpeptid **81** zeigt keinen eindeutigen Signalsatz mehr, was anhand der Seitenkette des Homoallylglycins (orange) verdeutlicht ist. Die Reaktion ist nicht ausreichend chemoselektiv für Peptide.

Ein Vergleich des Edukts **80** mit dem Rohpeptid **81** nach der Reaktion zeigt die unselektive Reaktion (siehe Abb. 3.20). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden keine weiteren Experimente zur Optimierung der Reaktion durchgeführt. Neben der harschen Ozonolyse bleibt mit der LEMIEUX-JOHNSON-OXIDATION eine weitere Möglichkeit zur oxidativen Spaltung des terminalen Olefins. Das Olefin wird zunächst in das entsprechende Diol durch eine Bishydroxylierung umgewandelt. Dabei bietet sich als einfachste Methode eine UPJOHN-DIHYDROXYLIERUNG mittels katalytischen Mengen an  $\text{OsO}_4$  und NMO als Kooxidans an.<sup>[324]</sup> Das entstehende 1,2-Diol wird im darauffolgenden Schritt durch eine Periodat-Spaltung in die entsprechende Carbonyl-Verbindung überführt. Die Kombination beider Reaktionen durch Substitution des NMOs gegen Natriumperiodat zur Diolspaltung und als Cooxidans stellt die LEMIEUX-JOHNSON-OXIDATION dar.<sup>[325]</sup> Ein Vorteil dieser Methode ist die wesentlich einfachere Handhabbarkeit der Reaktion und die bessere Verfolgung durch NMR-spektroskopische Methoden in wässrigem Phosphat-Puffer gegenüber der Ozonolyse. Es ist zu beachten, dass kein giftiges und leicht flüchtiges Osmiumtetroxid eingesetzt wird, sondern ein Kaliumosmat-Salz, das *in-situ* zur katalytisch aktiven Spezies oxidiert wird.

Zur Analyse der Reaktion wurde das synthetisierte Olefinpeptid **80** in wässrigem Phosphatpuffer bei pH 3 gelöst und mit katalytischen Mengen Kaliumosmat-Dihydrat sowie 5.0 eq Natriumperiodat versetzt. Innerhalb von Minuten konnte NMR-spektroskopisch die quantitative Bildung des Peptid-Aldehyds **81** nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.21).



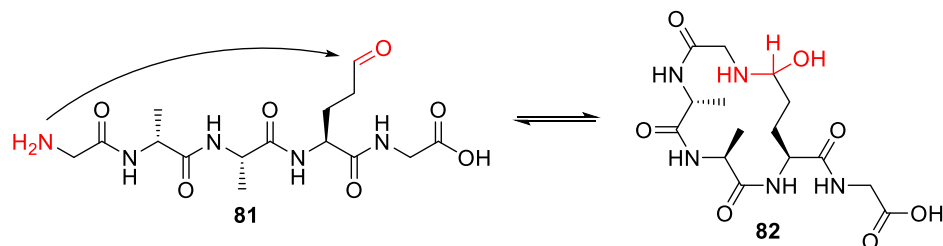


**Abbildung 3.21:** WATERGATE-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **80** und **81** (600 MHz, 300 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). **A)** Eduktspektrum des Peptids **80** vor Zugabe des Kaliumosmats und Natriumperiodats. **B)** Spektrum der gleichen Probe nach durchgeführter LEMIEUX-JOHNSON-Oxidation zu **81**. Zu erkennen ist die Transformation des Olefins (5.7 ppm) zum Aldehyd (9.5 ppm). Durch die oxidative Spaltung erhöht sich die Dispersion der amidischen Protonen des ehemaligen Homoallylglycins und des N-terminalen Glycins (8.1 ppm). An der Stelle des terminalen olefinischen Protonenpaares (5.0 ppm), dessen Intensität aufgrund der Wasserunterdrückung gering ist, wird in **B)** ein neuer Signalsatz detektiert, der dem cyclischen Halbaminal zugeordnet werden kann.

Gut zu erkennen ist die Entstehung des Aldehyds anhand des Singulett bei 9.5 ppm und dem olefinischen Signal von **80** bei 5.7 ppm, das nicht mehr detektiert werden kann. Zusätzlich zeigen die β- und γ-Protonen der Seitenkette des Aldehyds **81** (1.7 – 2.1 ppm) sowie die beiden NH-Signale (8.0 ppm) des ehemaligen Homoallylglycins und des N-terminalen Glycins eine höhere Dispersion. Im Produktspektrum B ist ein zusätzlicher neuer Signalsatz zu erkennen, der dem cyclischen Halbaminal zugeordnet werden kann. Das charakteristische Signal des Halbaminal-CHs liegt bei 5.0 ppm und tritt an die Stelle des terminalen Olefins. Dementsprechend entstehen neue Resonanzsignale im NH-Bereich für die amidischen Protonen. Diese schnelle, quantitative und gut mittels NMR-Spektroskopie analysierbare Methode konnte auf den N-terminalen Ring des Microcins H-GGAGHVPEY-OH sowie auf eine Phe5His-Mutante desselben Peptids erweitert werden, indem Homoallylglycin an der Stelle der Glutaminsäure in die Sequenz eingebaut wurde und dieses den Aldehyd in sehr reiner Form lieferte. Die Phe5His-Mutante wurde zunächst als Modellpeptid aus synthetischen Gründen hergestellt, da in diesem Peptid außer der *t*Bu-Schutzgruppe des Tyr keine weitere Schutzgruppe vorhanden ist. Im Folgenden wurde die Cyclisierungstendenz solcher Peptidaldehyde unter Anwesenheit von Kaliumosmat und Natriumperiodat durch schrittweise Erhöhung des pH-Wertes NMR-spektroskopisch analysiert.

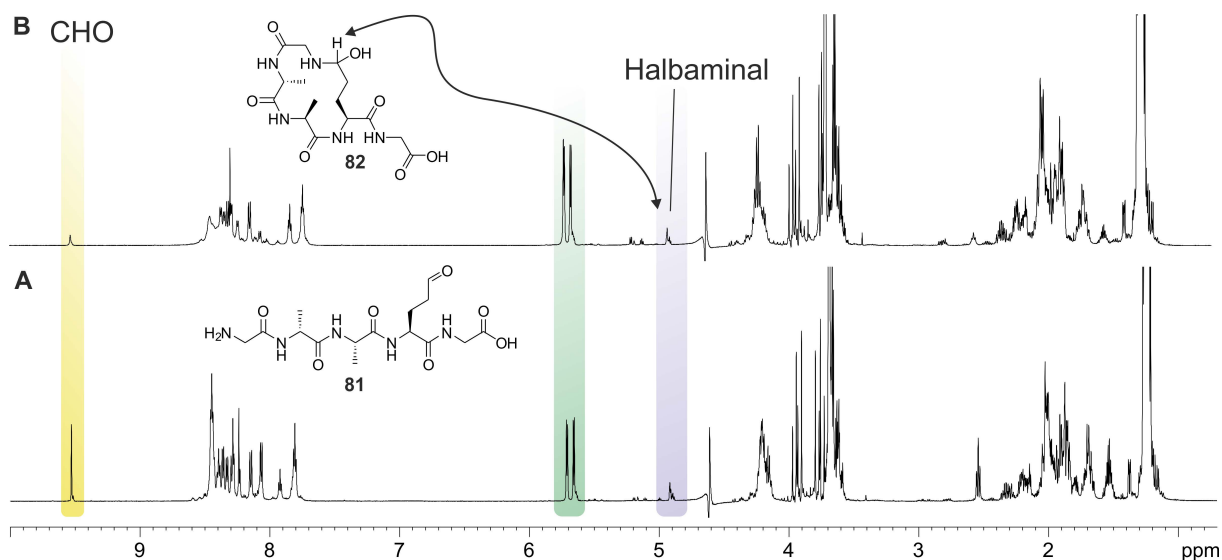
### 3.6.3 Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Olefine

Durch die selektive oxidative Spaltung von terminalen Olefinen werden Seitenketten-Aldehyde freigesetzt, die im sauren Milieu aktiviert werden können und eine erhöhte Reaktivität gegenüber Nucleophilen aufweisen. Bereits die Anwesenheit von N-terminalen Aminen oder Seitenketten-Aminen reicht zur Macrocyclisierung aus und kann im Anschluss an die oxidative Spaltung untersucht werden (siehe Schema 3.26). Dazu wurde der pH-Wert mit Hilfe einer wässrigen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (2%ig) von 3 auf 6.5 in kleinen Schritten erhöht und die Veränderung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums gemessen und analysiert.



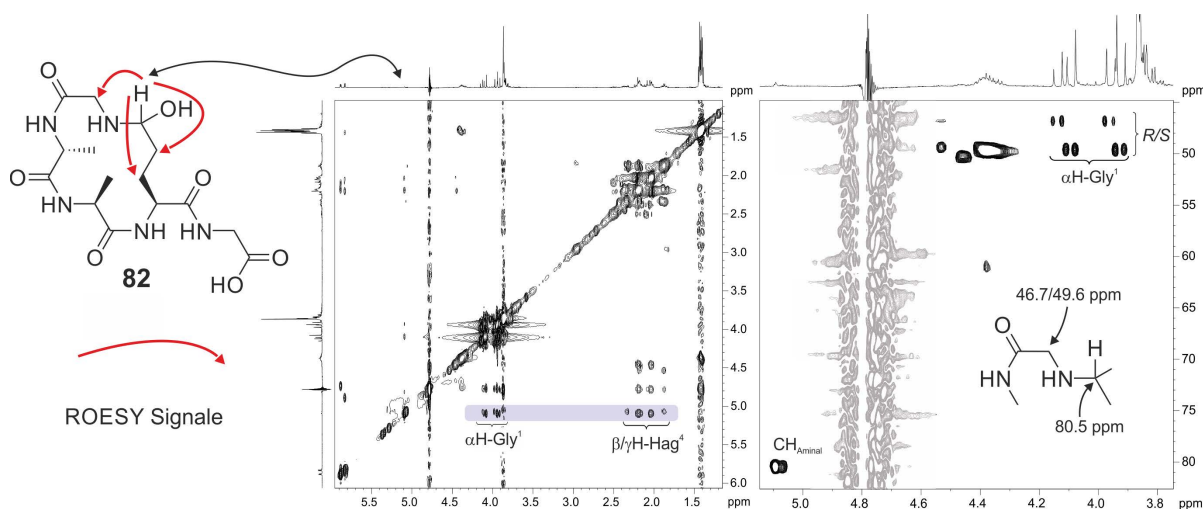
**Schema 3.26** Reversible Cyclisierung des oxidativ gespaltenen Modellpeptids **81**. Protonenkatalysiert erfolgt der nucleophile Angriff des Stickstoffs des N-terminalen Glycins an den Seitenketten-Aldehyd unter Entstehung eines cyclischen Halbaminals **82**.

Besonders stark verändern sich dabei die Verschiebungen in der Nähe der Cyclisierungsposition und des C-terminalen Peptidendes. Im Fall des bereits vorgestellten Modellpeptids **81** wird die Beobachtung gemacht, dass die erwähnten neu gebildeten Signalsätze von **82** bis pH 4.5 intensiver und die Intensität des Peptidaldehyds verringert werden.



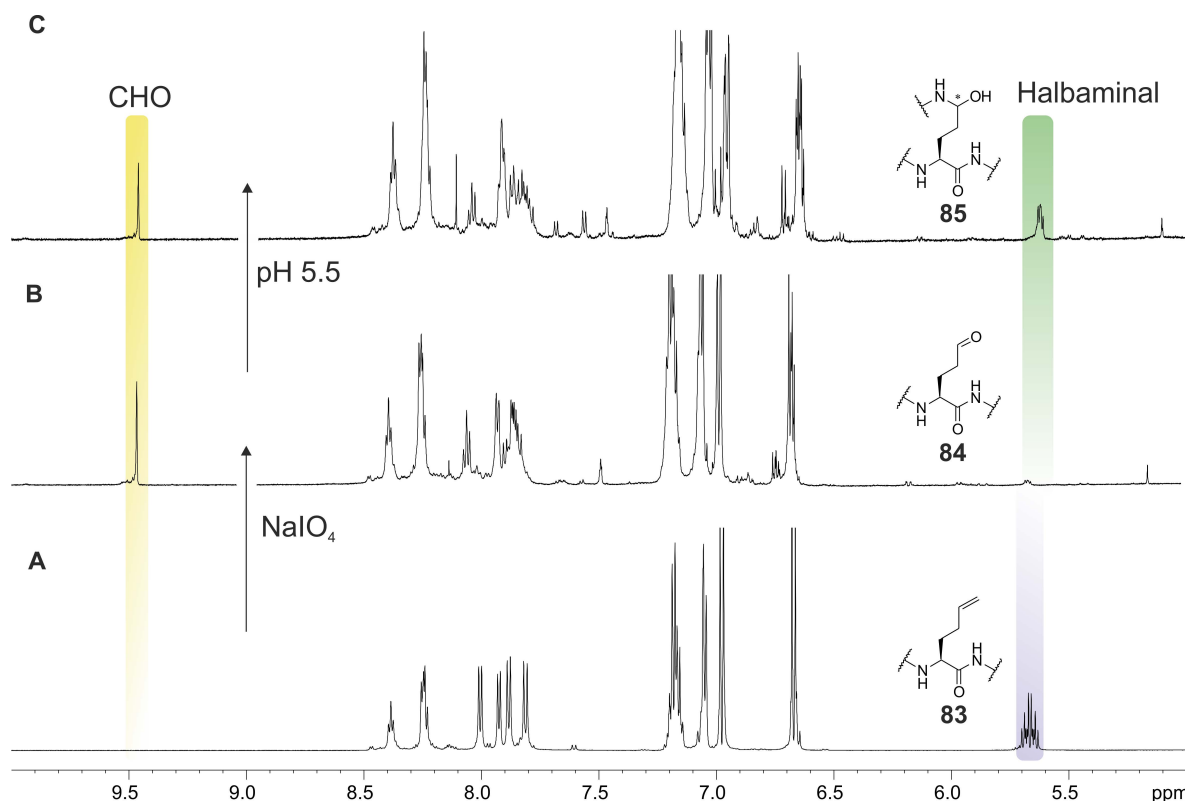
**Abbildung 3.22** WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR von **81** und **82** (600 MHz, 300 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). **A)** Aldehyd/Halbaminal Gemisch des Modellpeptids bei pH 4.5 und 300 K. **B)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei pH 5.5 und 300 K. Zu erkennen ist das geringe Signal des Aldehydprotons sowie das durch die Wasserunterdrückung kleine Signal des Halbaminals bei 4.9 ppm (blau). Das entstandene Signal bei 5.7 ppm (grün) zeigt eine Halbaminal-typische Verschiebung, konnte aber nicht genauer identifiziert werden.

Ab einem pH-Wert von 4.5 verschiebt sich das NH des C-terminalen Glycins aufgrund der erfolgenden Deprotonierung stärker ins Tieffeld des Spektrums. Über einem pH-Wert von 5 werden besonders die NH-Signale breiter und die Eduktverbindung **81** ist bis auf 11%, gemessen relativ zum Aldehydsignal, abgereagert (siehe Abb. 3.22). Auffällig sind außerdem zwei intensive Singulettts bei 8.03 und 8.29 ppm, welchen anhand des HSQC-Spektrums eine Imin-ähnliche  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung von 164.7 und 170.7 ppm zugewiesen werden konnte. Der Ringschluss wurde mittels 2D-NMR-Spektroskopie nachgewiesen, indem im ROESY-Spektrum die Kontakte des CH-Halbaminals von **82** zum  $\alpha\text{H}$ -Gly und der Seitenkette des Glu nachgewiesen werden konnten. In der CH-Korrelation wurde eine chemische Verschiebung von 80.5 ppm für das CH-Halbaminal nachgewiesen, die typisch für diese funktionelle Gruppe ist (siehe Abb. 3.23).



**Abbildung 3.23** Ausschnitt des ROESY-Spektrums (links) und des HSQC-Spektrum (rechts) von Peptid **82** (600 MHz, 310 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 4.5). Blau hervorgehoben sind die ROE-Kontakte des Halbaminale-CH, welches zu den  $\alpha\text{H}$  des Glycins und der Seitenkette des Homoallylglycins dipolar koppelt. Im HSQC-Spektrum konnte die für Halbaminale typische chemische Verschiebung von 80.5 ppm bestimmt werden. Zu erkennen ist die diastereotope Methylengruppe des Gly<sup>1</sup>, die aufgrund der auftretenden Diastereomere zwei Signalsätze zeigt. Das Wassersignal wurde zur besseren Übersicht in den Hintergrund gerückt.

Eine weitere Zuordnung der Signale konnte aufgrund der Qualität der Spektren nicht durchgeführt werden. Als Hauptgrund für die schlechte Qualität der Spektren wurde die noch anwesende Osmat/Periodat-Mischung angesehen, welche die Oxidationskraft besitzt Aldehyde, Halbaminale oder Imine weiter zu oxidieren und somit zu viele Verbindungen in der Probe enthalten sind. Basierend auf der Vielzahl an vorhandenen peptidischen Strukturen nimmt die Signalintensität ab und eine Detektion der Signale in 2D-NMR-Spektren wird erschwert. Um die Weiteroxidation zu vermeiden, wurde im nächsten Experiment 5 min nach Zugabe des Periodats eine äquivalente Menge an Natriumthiosulfat zu der NMR-Probe hinzugefügt und mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie erkannt, dass die amidischen Signale schneller austauschen und kein definierter Signalsatz identifiziert werden konnte.

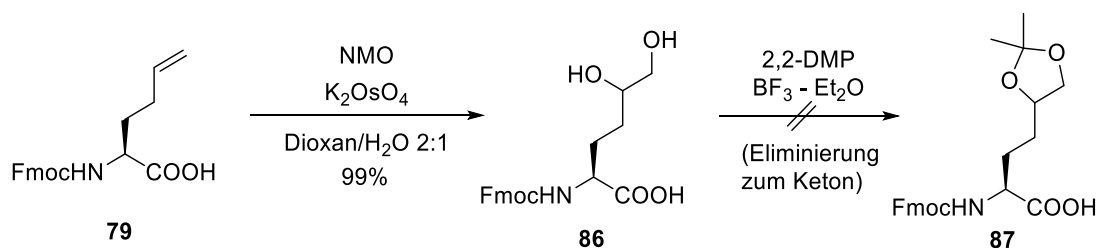


**Abbildung 3.24** WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR von **83** bis **85** (600 MHz, 300 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). **A)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der His5Phe-Mutante des N-terminalen Rings des Microcins J25 als Olefinpeptid **83**. Gut zu erkennen ist das CH-Signal des terminalen Olefins bei 5.7 ppm. **B)** Nach erfolgreicher oxidativer Spaltung wird der Peptidaldehyd **84** (9.53 ppm) erhalten und in geringen Mengen entsteht bereits das Halbaminal **85** (5.73 ppm). **C)** Nach vier Stunden Reaktionszeit bei pH 3 kann ein äquimolares Verhältnis von Aldehyd **84** und Halbaminal **85** identifiziert werden.

Um trotzdem die Cyclisierungstendenz des N-terminalen Macrocyclus des Lasso-peptids Microcins J25 zu analysieren, wurde das Homoallylglycin in die His5Phe-Mutante H-GGAGFVPXY-OH **83** (X = Hag) eingebaut und nach Freisetzung des Aldehyds **84** bei pH 3 der pH-Wert nicht weiter erhöht, sondern  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in Abständen von 1 h aufgenommen. Durch den geringen pH-Wert konnten unspezifische Nebenreaktionen weitgehend unterdrückt werden und die Signale des Aldehyds **84** (9.53 ppm) und des Halbaminals **85** (5.73/82.4 ppm) in gleichen Anteilen identifiziert werden (siehe Abb. 3.24). Durch anschließende Erhöhung des pH-Wertes traten die gleichen Probleme wie im Fall des Modellpeptids auf. Zur Vollständigkeit wurde das NMR-Experiment ebenfalls für die native Sequenz H-GGAGHVPXY-OH (X = Hag) sowie für die vollständige Microcin J25 Sequenz durchgeführt. Es konnte dieselbe Reaktivität bezüglich des terminalen Olefins beobachtet werden. Dies führte zusammen mit der Größe des Peptids und dem damit verbundenen komplexen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu keiner analysierbaren Macrocyklisierung. Die entstehenden Signalsätze und die Verbreiterung der Signale lieferten keine strukturelle Information. Lediglich die Entstehung von Imin-Verbindungen konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden.

### 3.6.4 Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über terminale Dirole

Durch die permanente Anwesenheit des stark oxidierenden Osmiumtetroxids während der Cyclisierung kommt es je nach vorhandenen Aminosäuren schnell zu Überoxidationen, die in dieser Art unerwünscht sind und vermieden werden müssen. Eine Möglichkeit dies zu vermeiden wäre die präparative Aufreinigung nach erfolgreicher Reaktion mittels HPLC. Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit und des zu geringen Probenvolumens, welches durch das HPLC-System toleriert wurde, konnte diese Methode nicht sinnvoll durchgeführt werden. Ein synthetischer Lösungsansatz ist die Einführung des Diols auf der Ebene des monomeren Aminosäure-Bausteins. Dies hat den Vorteil, dass post-synthetisch zur oxidativen Spaltung nur Natriumperiodat in äquimolaren Mengen zugesetzt werden muss und auf die Zugabe von Kaliumosmat verzichtet werden kann. Die Synthese eines solchen Bausteins basiert auf dem terminalen Olefin **79**, das bishydroxyliert und anschließend adäquat geschützt werden muss. Als Edukt wurde das bereits dargestellte Fmoc-geschützte Homoallylglycin (**79**) eingesetzt, das mit Kaliumosmat und NMO zu **86** bishydroxyliert wurde. Durch die Kondensation mit Aceton sollte die funktionelle Gruppe während der Festphasensynthese geschützt werden. Die Schützung wurde mit 2,2-DMP und katalytischen Mengen an  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  durchgeführt. Nach 2 h wurde mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt, dass sich nicht das gewünschte Produkt **87** gebildet hat und die Reaktion wurde für weitere 2 h auf 50 °C erwärmt. Die erhöhte Temperatur führte allerdings nicht zum gewünschten Produkt, sondern zur spontanen Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe sowie zur Bildung des Seitenkettenketons, basierend auf der Eliminierung des terminalen Hydroxyls (siehe Schema 3.27).

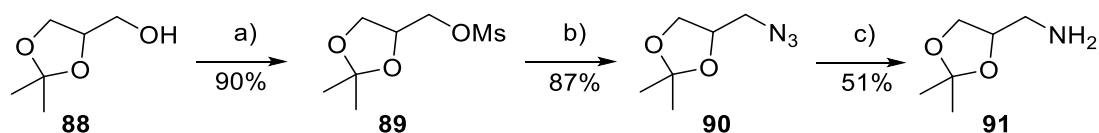


**Schema 3.27** Bishydroxylierung des Fmoc-Hag-OH (**79**) mit Kaliumosmat und NMO. Die anschließende Schützung des terminalen Diols **86** zum Acetonid **87** konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Das Edukt eliminierte im Laufe der Reaktion zum entsprechenden Seitenketten-Keton.

Es wurde deutlich, dass die Synthese einer entsprechenden Precursor-Aminosäure eines Seitenkettenaldehyds kompliziert und zu zeitaufwendig ist. Es wurde eine einfachere, ökonomischere und vom synthetischen Ansatz grundverschiedene Syntheseroute entwickelt, die im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

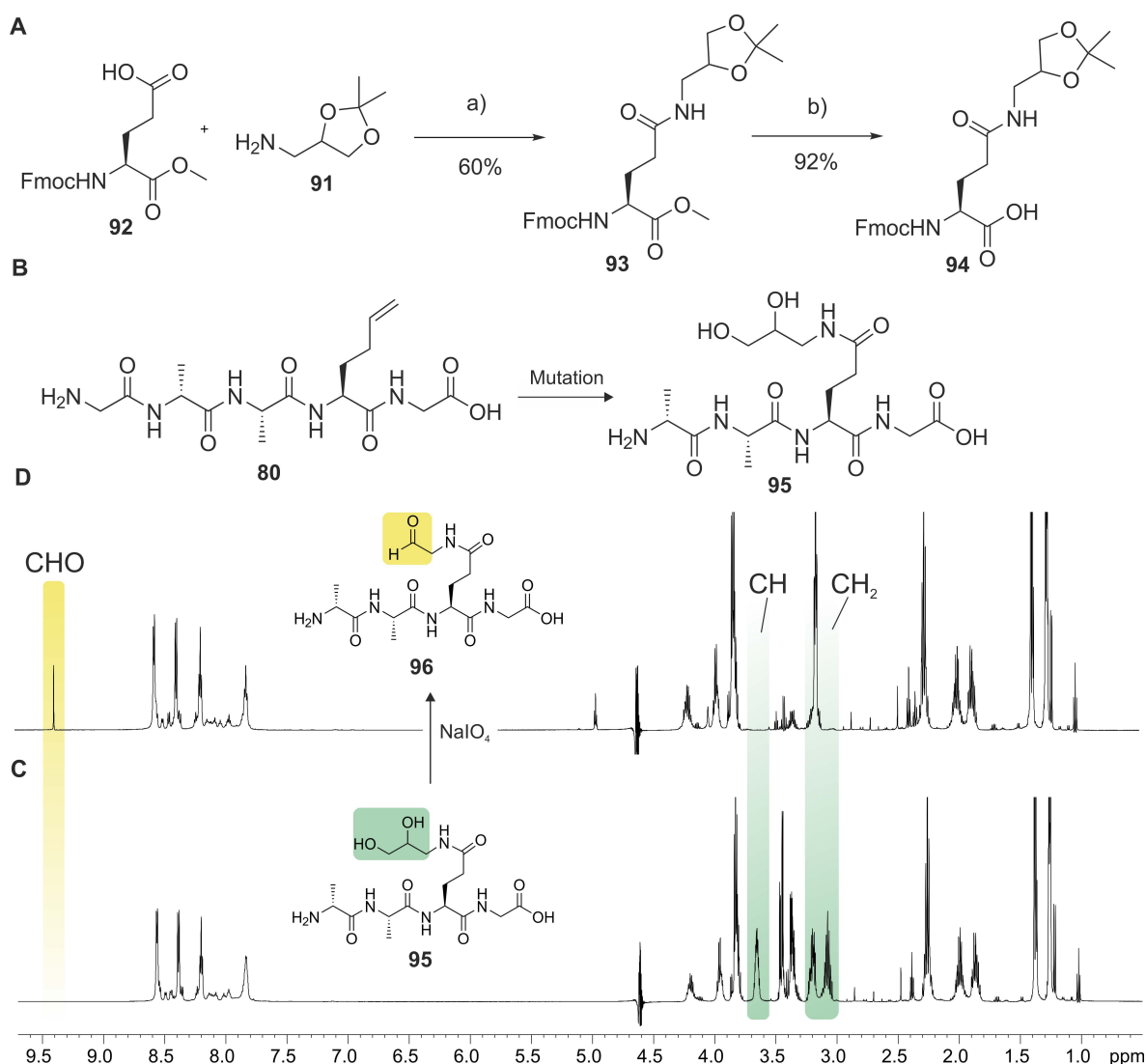
### 3.6.5 Synthese von Seitenketten-Peptidaldehyden über ein Dipeptid

Die aufwendige lineare Synthese und Schutzgruppenproblematik am Ende der Synthese der Seitenketten-Peptidaldehyde führten zu keinem verwendbaren Monomerbaustein, der in der Festphasensynthese eingesetzt werden kann. Die Synthesestrategie wurde nachfolgend konvergent durchgeführt und ein Acetonid-geschütztes Diol in Form des kommerziell verfügbaren C3-Bausteins **88** in der Syntheseroute eingeplant. Die Idee war, die vorhandene Reaktivität der Carboxylgruppe der Glutaminsäure-Seitenkette zu nutzen und mittels Kupplungsreagenzien eine Amidbindung zu knüpfen. Zur Synthese eines solchen Monomers wurde von racemischem Solketal (**88**) ausgegangen, das in drei Stufen im Multigramm-Maßstab in 40% Gesamtausbeute zum 2,2-Dimethyl-4-aminomethyl-1,3-dioxolan umgesetzt wurde (**91**, Gld, siehe Schema 3.28). Das entsprechende Alkylamin **91** weist in der  $\alpha$ -Position ein Acetonid-geschütztes Diol auf und wird mit dem Dreibuchstabencode Gld für Glycindiol abgekürzt. Basierend auf den Primärsequenzen der Lasso peptide, die in der Klasse II und III vertreten sind, befindet sich N-terminal ein Glycin, das sich als entsprechend modifiziertes Alkylamin **91** eignet. Durch die Kupplung an die Seitenkette der Glutaminsäure wird der retrosynthetische Schnitt der Macrocyclisierung um eine Stelle im Gegensatz zur nativen Cyclisierungsposition verschoben, wodurch aber dennoch die native Struktur erhalten werden kann (siehe Abb. 3.25-B).



**Schema 3.28** Synthese des Alkylamins (**91**, Gld) als Glycin Derivat. Reagenzien und Bedingungen: a) MsCl, DIPEA, DCM, 0 °C, 12 h; b) NaN<sub>3</sub>, DMF/H<sub>2</sub>O 1:1, 110 °C, 6 h; c) PPh<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O 1:1, 55 °C, 16 h. Die Gesamtausbeute über die drei Stufen beträgt 40%.

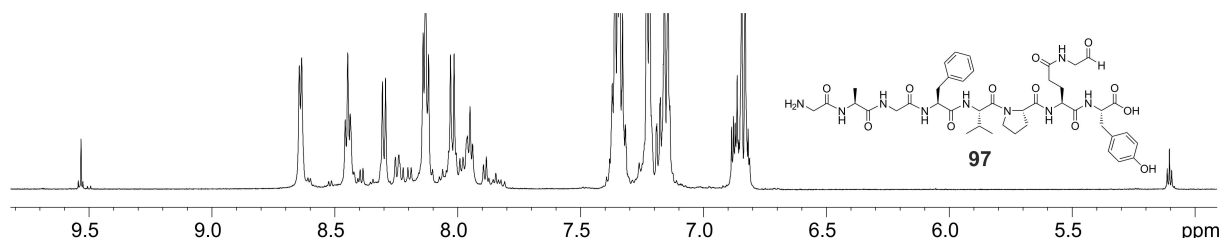
Für die Kupplung des Gld **91** an die Seitenkette der Glutaminsäure muss diese, ausgehend von Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, umgeschützt werden. Die kommerziell erhältliche Aminosäure wurde in Methanol mit EDC und HOBT in Gegenwart von DIPEA umgesetzt. Durch die Aktivierung der Carboxylat-Gruppe entsteht unter milden Bedingungen der  $\alpha$ -Methylester. Die konventionelle säurekatalysierte Veresterung konnte aufgrund des anwesenden *tert*-Butylesters, der durch katalytische Mengen an Säure bereits gespalten wird, nicht durchgeführt werden. Die Spaltung des *tert*-Butylesters in der Seitenkette erfolgte mit absoluter TFA bei 40 °C für 2 h. Es wurde die Aminosäure Fmoc-Glu(OH)-OMe (**92**) nach wässriger Aufarbeitung erhalten.



**Abbildung 3.25 A)** Darstellung des in der Festphasensynthese einsetzbaren Monomers **94**. Reagenzien und Bedingungen: a) EDC, HOBt, DIPEA, DMF/DCM 1:5, 12 h, RT; b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%ig)/Acetonitril (1:1). Die Gesamtausbeute beträgt 55%. **B)** Modifizierung des Modellpeptids **80** mit Homoallylglycin als zentraler Baustein zum Peptid **95**. Die Seitenkette der Glutaminsäure wurde mit dem N-terminalen Glycin erweitert, das als geschütztes Diol-Derivat **91** vorliegt und nach Entschützung mittels Diol-Spaltung den Aldehyd freisetzt. **C)** WATERGATE-<sup>1</sup>H-NMR von **95** und **96** (600 MHz, 300 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Spektrum des entschützten Diol-Peptids **95** vor der oxidativen Spaltung. Zu erkennen sind die Alkoxyisignale des Glycin-Derivats im Bereich von 3.0 – 3.5 ppm (grün). **D)** Nach Zugabe von Natriumperiodat ist die Transformation zum Peptidaldehyd **96** anhand der Signale des Aldehyds (9.38 ppm, gelb), des Hydrats (4.95 ppm) sowie der fehlenden Alkoxyisignale zu erkennen. Das restliche Spektrum verändert sich nur gering.

Es erfolgt die EDC/HOBt vermittelte Kupplung der freien Carbonsäure **92** mit dem Amin **91** in 60% Ausbeute. Nach abschließender und selektiver Verseifung des Methylesters mit wässriger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%ig) wird, das in der Peptidsynthese einsetzbare Monomer, Fmoc-Glu[Gld]-OH (**94**) erhalten (siehe Abbildung 3.25-A). Basierend auf den bisherigen Experimenten zur oxidativen Spaltung des terminalen Olefins wurde das Modellpeptid **80** mit dem Monomer **94** erweitert, indem Homoallylglycin durch **94** substituiert und das Peptid **80** um die N-terminale Aminosäure Glycin verkürzt wurde (siehe Abbildung 3.25-B). Die Vorteile des neuen Monomers sind die einfachere Synthese und die chemoselektive Freisetzung des

Aldehyds ohne Kaliumosmat. Das erhaltene weiterentwickelte Modellpeptid **95** weist nach Abspaltung vom Harz und globaler Entschützung ein terminales Diol auf, das durch Zugabe von 1.00 eq Natriumperiodat oxidativ gespalten werden kann. Das Diol-Peptid **95** wurde in wässrigem Phosphatpuffer gelöst und mit der entsprechenden Menge Natriumperiodat versetzt. Es entsteht selektiv der Peptidaldehyd **96** ohne die Verwendung des starken Oxidationsmittels Osmiumtetroxid (siehe Abb. 3.25-C und D). Neben dem neugebildeten Signal des Aldehyds bei 9.38 ppm (gelb) kann das Verschwinden der Alkoxygruppen CH/CH<sub>2</sub> (3.70 ppm und 3.08/3.20 ppm, grün) sowie die Verschiebung der  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe (3.36/3.45 ppm zu 3.15 ppm) beobachtet werden. Zur Vollständigkeit wurde die Methode ebenfalls auf den N-terminalen Ring des Microcins J25 sowie auf dessen His5Phe-Mutante **97** angewendet (siehe Abbildung 3.26) und in beiden Fällen ein entsprechendes Aldehyd/Hydrat-Gemisch erhalten. Die Cyclisierungstendenz, dieser *in-situ* hergestellten Peptidaldehyde, wird im nachfolgenden Kapitel ausführlicher untersucht.

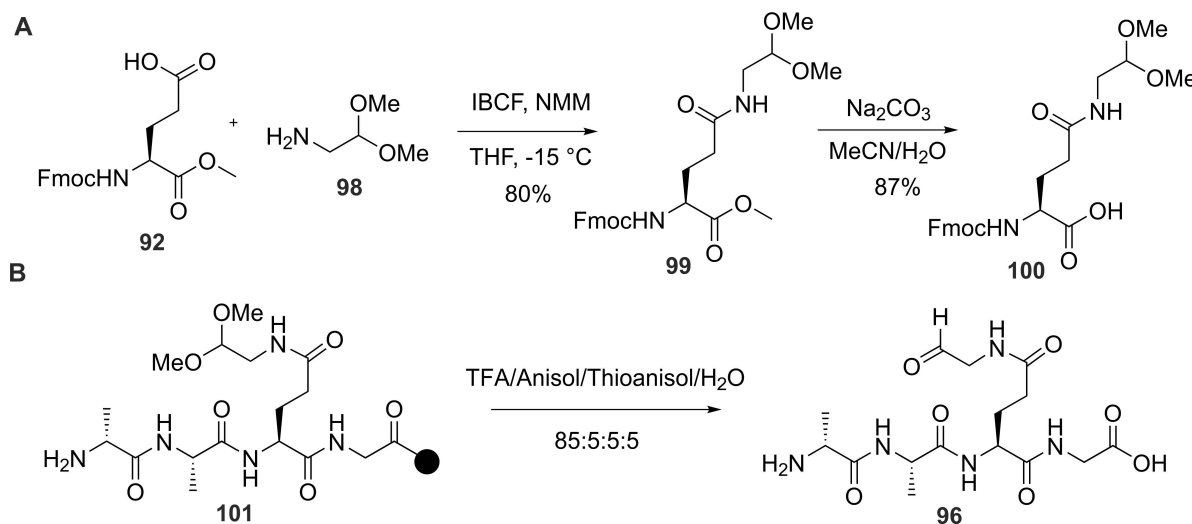


**Abbildung 3.26** WATERGATE-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, 300 K, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 5:1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) der His5Phe-Mutante **97** des N-terminalen Rings des Microcins J25 als ehemaliges Diolpeptid, das bereits mit Natriumperiodat zum Aldehyd umgesetzt wurde. Gut sichtbar sind das Aldehydsignal und das Signal des Hydrats bei 5.1 ppm.

Basierend auf dem einfachen und kommerziell erhältlichen Glycin-Derivat, das in die Seitenkette der Glutaminsäure eingebaut werden kann, wurde nach einem ähnlichen C3-Baustein gesucht, der kein Precursor eines Aldehyds, sondern direkt den geschützten Glycin-Aldehyd darstellt. Mit diesem ebenfalls kommerziell erhältlichen, als Dimethylacetalgeschützten Glycin-Aldehyd **98** wurde analog dem Diolmonomer **91** verfahren. Benannt wurde dieser C3-Baustein mit dem Dreibuchstabencode Gla für Glycinaldehyd. Die Synthese des entsprechenden und in der Festphasensynthese einsetzbaren Monomers **100** erfolgte in vier Stufen und konnte in einer Gesamtausbeute von 66% erhalten werden (siehe Schema 3.29-A). Der Einbau eines solchen geschützten Derivats ermöglicht die direkte Synthese eines als Acetal geschützten Peptidaldehyds **101**, wodurch keine weiteren chemo- und regioselektiven Reaktionen benötigt werden. Durch die Redox-empfindliche Aldehydgruppe, analog der C-terminalen Peptidaldehyde, kann bei der Abspaltung der Peptide nicht die Abspatlösung B verwendet werden, da durch anwesendes TIPS oder TES der Aldehyd reduziert wird. Eine Abspaltung mittels wässriger TFA (95%ig) ist möglich, kann aber bei Schutzgruppen, die während der Abspaltung reaktive Carbenium-Ionen bilden, nicht



angewendet werden. Um die reaktiven Trityl-, *t*Bu-Kationen und Pbf-Schutzgruppen abzufangen, wurde auf ein Abspaltprotokoll von RUSH et al. zurückgegriffen.<sup>[235]</sup> Mit der Abspaltlösung C (TFA/Thioanisol/Anisol/H<sub>2</sub>O, 85:5:5:5) wurden Anisol und Thioanisol erfolgreich als Scavenger während der Abspaltung eingesetzt und die Oxidationsstufe des Seitenketten-Aldehyds **81** erhalten (siehe Schema 3.29-B).

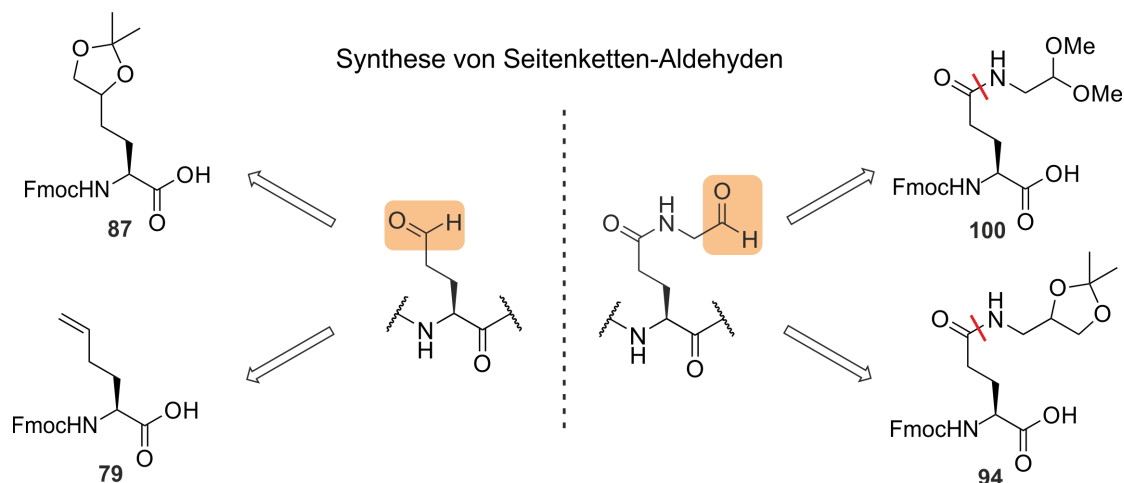


**Schema 3.29 A)** Synthese des in der Festphasensynthese einsetzbaren Monomers **100**, das in einer Gesamtausbeute von 66% in vier Stufen erhalten wurde. Die Aktivierung der Seitenketten-Carbonsäure erfolgte durch ein gemischtes Anhydrid und die abschließende Hydrolyse des Methylesters **99** wurde selektiv mit einer wässrigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%ig) durchgeführt. **B)** Die Synthese des entsprechenden Modellpeptids **101** erfolgte durch manuelle Festphasenpeptidsynthese und das Peptid **96** konnte nach Abspaltung mit TFA/Anisol/Thioanisol/H<sub>2</sub>O (85:5:5:5) erhalten werden.

Beide Syntheserouten des Modellpeptids **96** führten zu derselben Verbindung und haben unterschiedliche Vor- bzw. Nachteile. Durch die chemoselektive Diolspaltung von **95** konnte der Aldehyd zu einem gewünschten und flexiblen Zeitpunkt freigesetzt werden. Es musste verbleibendes Iodat abgetrennt werden, um Weiteroxidationen zu vermeiden. Die direkte Freisetzung des Aldehyds während der Abspaltung des Peptids **101** erforderte gesonderte Abspaltbedingungen und die Reaktivität des Aldehyds muss beachtet werden.

Im Vergleich aller vorgestellten Synthesemethoden für Seitenketten-Peptidaldehyde sind die letzten Methoden, die den Aldehyd über ein Dipeptid-Baustein einführen, am einfachsten herzustellen und am besten für die Festphasensynthese geeignet. Die Ozonolyse sowie die oxidative Spaltung einer Doppelbindung führten zu Peptidaldehyden, welche aber in der nachfolgenden Cyclisierung nicht verwendet werden können. Durch die Synthese des Diol-Dipeptid-Bausteins konnte der Seitenketten-Aldehyd gezielt freigesetzt und durch die Einführung des geschützten Aldehyd-Dipeptid-Bausteins der Aldehyd bereits während der Abspaltung des Peptids von der festen Phase entschützt werden. Ein Nachteil der Methoden ist die schlechte Erweiterung auf andere biologische Systeme oder Peptide aufgrund des

speziellen Monomers mit Glycin und Glutaminsäure. Die synthetisierten Peptide sind lagerbar, lassen sich mittels HPLC aufreinigen und sind über NMR-Spektroskopie analysierbar. Asparaginsäure lässt sich analog der vorgestellten Synthese an Stelle der Glutaminsäure in der Synthese einsetzen und in Peptide einfügen. Dies ist für Lasso peptide wie Capistrin und Anantin, die über die Seitenkette der Asparaginsäure cyclisiert werden, essentiell. Eine zusammengefasste Darstellung, welche die synthetisierten Aminosäuren beider Syntheserouten veranschaulicht, ist in Abbildung 3.27 gezeigt.

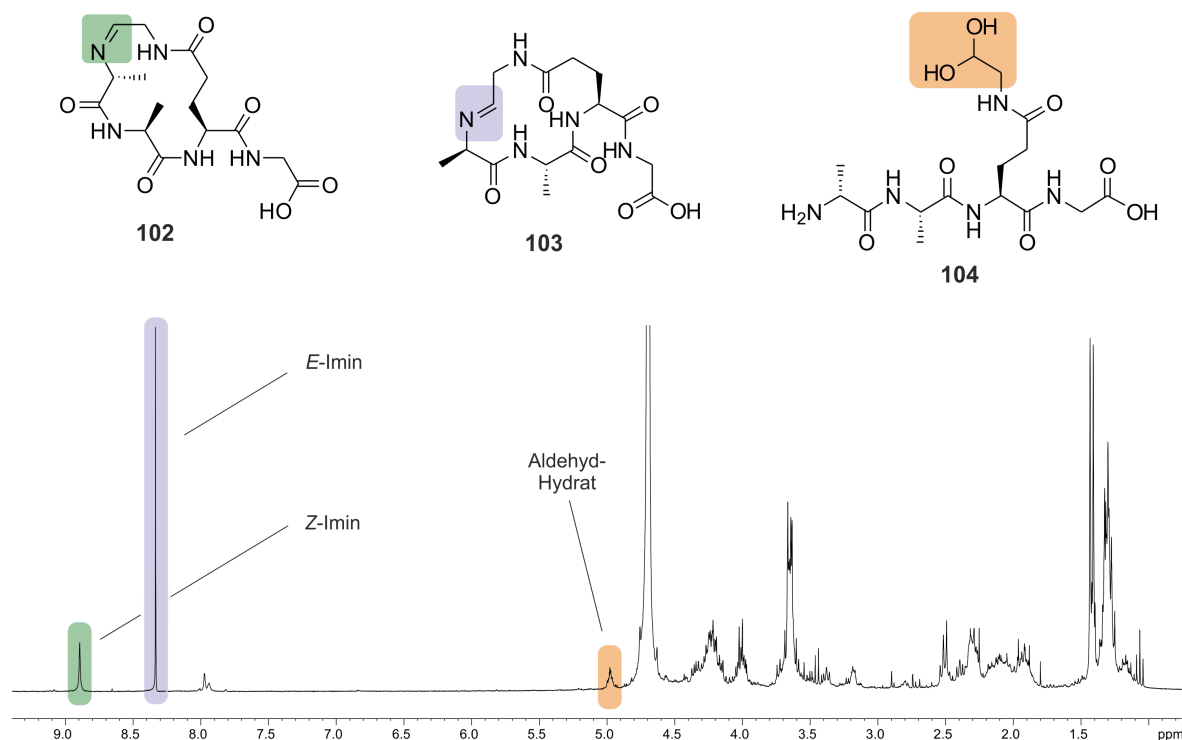


**Abbildung 3.27** Zusammenfassende Darstellung der Synthese von Seitenketten-Aldehyden. Links gezeigt sind die Retrosynthesen des terminalen Olefins **79** und des Diols **87**, basierend auf dem Seitenketten-Aldehyd der Glutaminsäure. Rechts dargestellt sind die Erweiterungen der Glutaminsäure-Seitenkette mit einem geschützten Glycin-Aldehyd **100** oder einem Glycin-Aldehyd Vorläufer **94**. Die Synthese der rechts abgebildeten Monomere ist kürzer und mit höherer Ausbeute realisierbar.

### 3.6.6 Cyclisierung von Seitenketten-Peptidaldehyden über ein Dipeptid

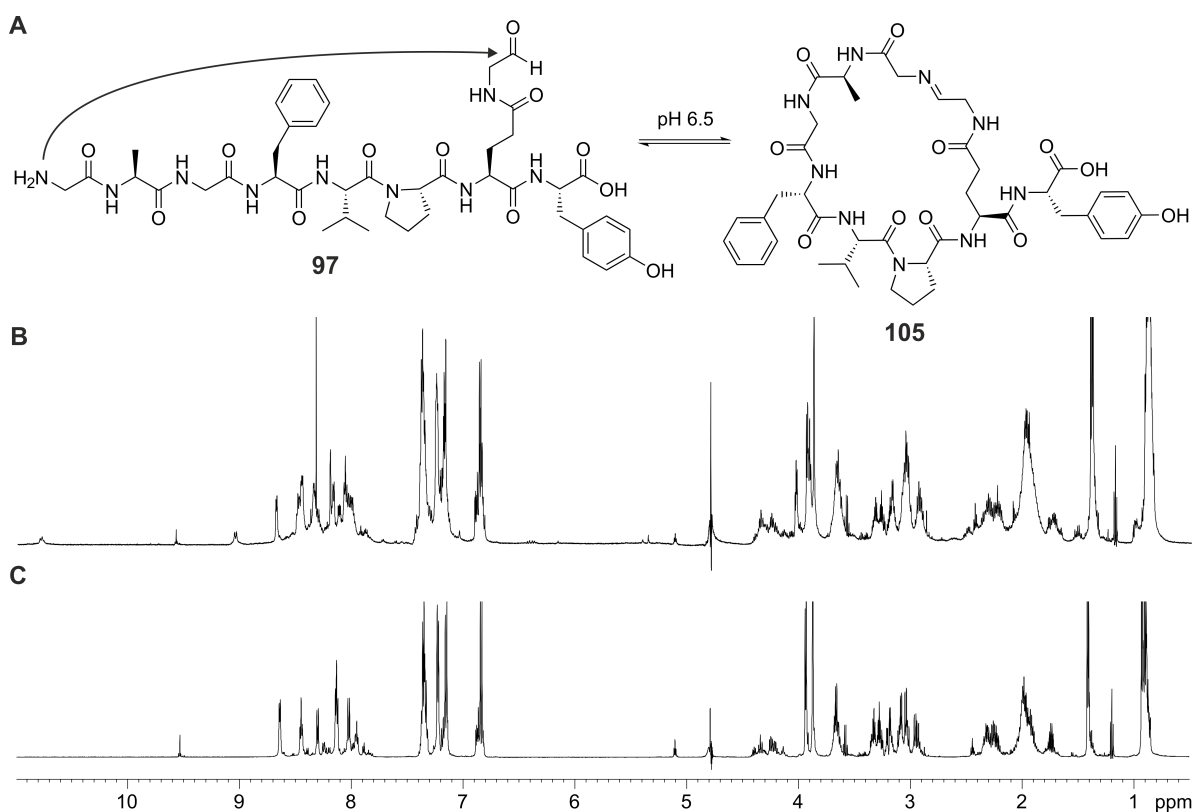
Bei der Analyse des Seitenketten-Peptidaldehyds **96** in wässrigem Phosphat-Puffer wurden bei einem pH-Wert von 3 nach der Messung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums neue Signalsätze beobachtet, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung cyclischen Halbaminale zugeordnet werden konnten. Im Folgenden wird die Cyclisierung, der im vorherigen Kapitel aufgeführten Seitenketten-Peptidaldehyd, näher analysiert. Ähnlich des Olefinpeptids **80**, das nach oxidativer Spaltung durch Erhöhung des pH-Werts in die cyclische Struktur **82** überführt wurde, wird der Einfluss von pH-Wert, Temperatur und Lösungsmittel auf den Dipeptid-Seitenketten-Aldehyd **96** untersucht.

Zunächst wird erneut das Modellpeptid **96**, das über beide Dipeptid-Strategien synthetisiert wurde, unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.6.3 cyclisiert und die Bildung des cyclischen Halbaminals **82** (siehe Abb. 3.23, S. 80) beobachtet. Zur weiteren Analyse der Imin-Bildung wurde das Experiment in reinem  $\text{D}_2\text{O}$  wiederholt und der pH-Wert auf 6.5 erhöht. Dies hat den Vorteil, dass im NH-Bereich aufgrund des schnellen H/D-Austauschs keine Signalüberlappung auftritt und die Signale der cyclischen Imin-Spezies leichter identifiziert werden können. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in Abbildung 3.28 zeigt das (*Z*)-Imin **102** (grün) und das (*E*)-Imin **103** (blau) als die Hauptprodukte der Cyclisierung sowie das nicht reagierte Aldehyd-Hydrat **104** (orange).



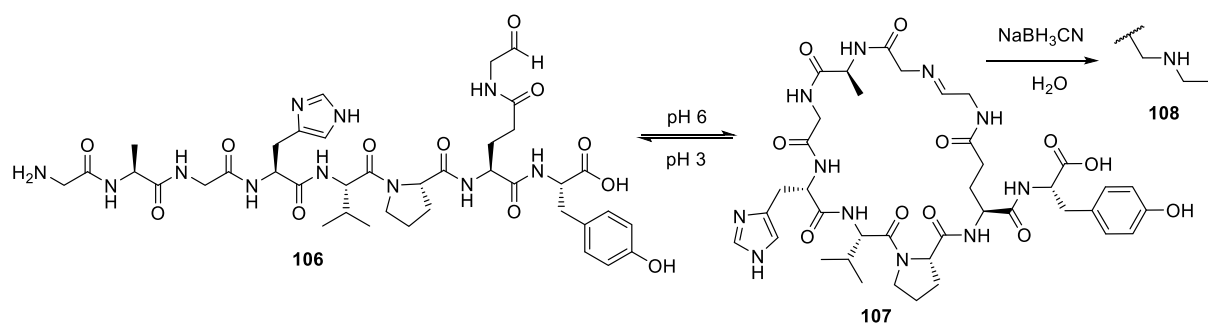
**Abbildung 3.28**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **102-104** (400 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7). Markiert sind die jeweiligen Signale des Aldehyd-Hydrats **104** (orange) sowie das entsprechende (*Z*)-Imin **102** (grün) und (*E*)-Imin **103** (blau). Die chemische Verschiebung der Imin-Signale in der CH-Korrelation liegt bei 155 ppm.

Die Zuordnung der Imin **102** und **103** konnte nicht eindeutig durchgeführt werden, da ein inverses Verhältnis vorliegen kann. Zur Prüfung der Übertragbarkeit der Cyclisierung auf Lasso peptide wurde die synthetisierte His5Phe-Mutante **97** des N-terminalen Abschnitts des Microcins J25 aus Kapitel 3.6.5 den Bedingungen der reversiblen Cyclisierung unterworfen (siehe Abb. 3.29-A). Die Analyse der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigt, analog dem Modellpeptid **96**, Signale zwischen 5 und 6 ppm, die dem Halbaminale aber auch dem Hydrat zugeordnet werden können (Abb. 3.29-B und C). Durch Erhitzen der Probe auf 40 °C bei pH 7 für 2 h können scharfe Singulets zwischen 8 und 9 ppm identifiziert werden, die ein Indiz für das gebildete Imin **105** sind. In den 2D-NMR-Spektren, der im Gleichgewicht vorliegenden Verbindung, konnten ebenfalls Imin-Signale detektiert werden. Der Ringschluss des Peptids **97** konnte aufgrund der geringen Intensität in diesem Fall nicht über das ROESY-Spektrum bestätigt werden.



**Abbildung 3.29 A)** Reversible Cyclisierung des Seitenketten-Peptidaldehyds der His5Phe-Mutante **97** des N-terminalen Rings des Microcin J25. Gezeigt ist der nucleophile Angriff des N-terminalen Glycins an die Carbonylfunktion des Glycinaldehyds in der Seitenkette der Glutaminsäure. **C)** WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR von **97** (600 MHz, 300 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) bei pH 3. **B)** Die Erhöhung des pH-Werts auf 5.5 führt zur Bildung neuer Signalsätze. Zwischen 5 und 6 ppm sind Signale des Halbaminals sowie zwischen 8 und 9 ppm die des Imins **105** erkennbar.

Durch die Einstellung des Gleichgewichts und die hohe Anzahl an möglichen cyclischen Verbindungen konnten die macrocyclischen Peptide nicht genauer NMR-spektroskopisch identifiziert und analysiert werden.

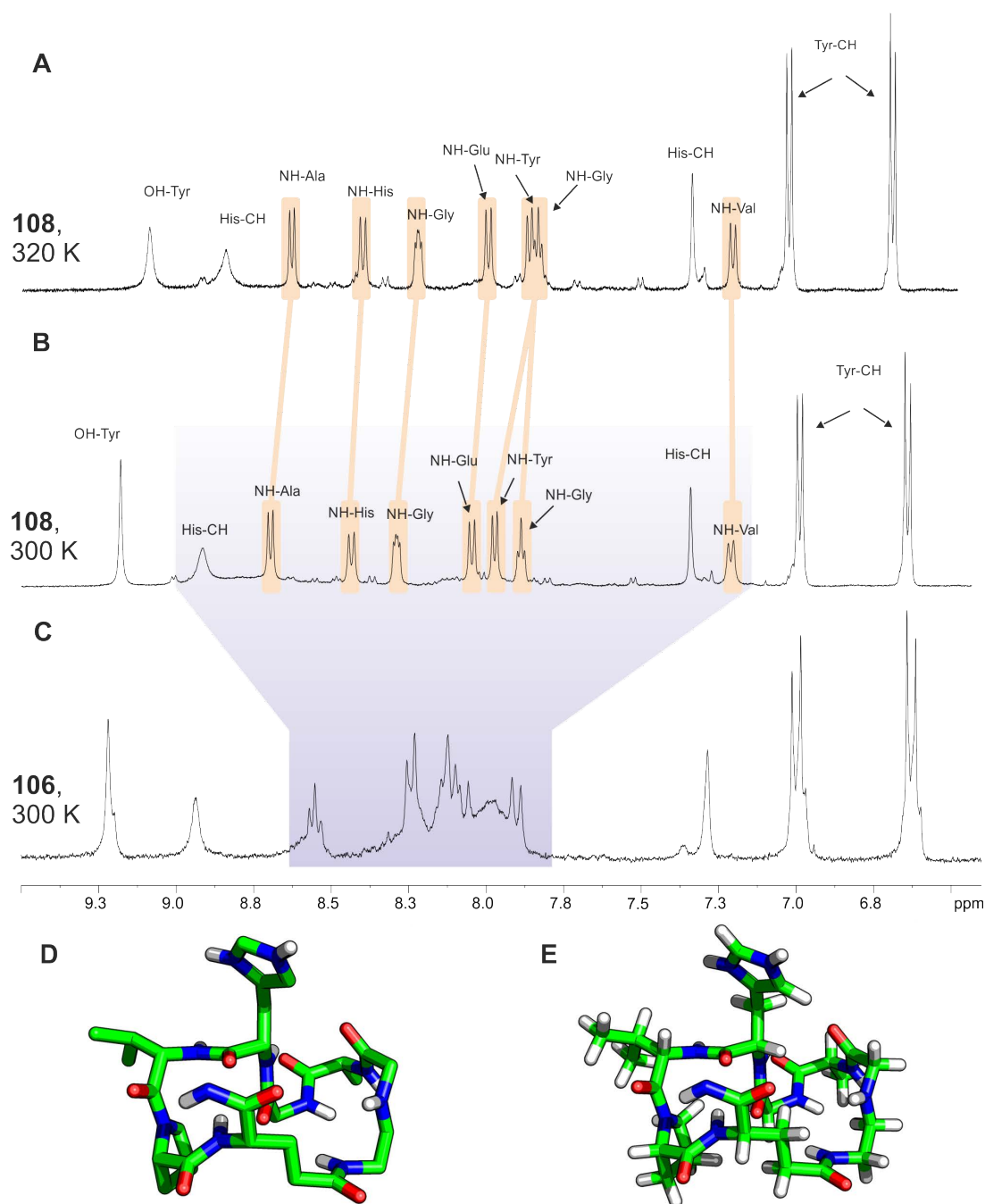


**Schema 3.30** Einstellung des pH-sensitiven Gleichgewichts der Imin-Cyclisierung des Peptidaldehyds **106** bei pH 6. Das gebildete Imin **107** wird direkt durch reduktive Aminierung in das sekundäre Amin **108** überführt, aufgereinigt und isoliert.

Eine Methode, die bereits im Rahmen eines cyclischen Hexapeptids in Kapitel 3.1.5 vorgestellt wurde, ist die Entfernung des Imins aus dem Gleichgewicht mittels reduktiver Aminierung zum Amin (siehe Schema 3.30). Das durch Kondensation gebildete Imin **107** wird durch Reduktion zum entsprechenden Amin **108** aus dem Gleichgewicht entfernt und die Reaktion auf die Seite des Macrocyclus verschoben. Die Reduktion erfolgte mittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  (5:1) mit dem Aldehyd des nativen N-terminalen Rings des Microcins J25 **106** und lieferte den macrocyclischen Ring nach semi-präparativer Aufarbeitung als sekundäres Amin **108**. Im Vergleich mit dem offenkettigen Peptid ist im NH-Bereich eine ausgeprägte Dispersion der NH-Signale zu erkennen, welche auf die Macrocyclisierung und deren kovalente Fixierung des Peptidrückgrats zurückzuführen ist. In Abbildung 3.30-A/C sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindungen und die geringe Temperaturabhängigkeit der NH-Signale des cyclischen Peptids **108** dargestellt. Die Abhängigkeit der NH-Signale von der Temperatur variiert zwischen 2.0 – 6.8 ppb/K und die einzelnen Temperaturgradienten sind in Tabelle 3.2 detailliert aufgeführt. Im ROESY-Spektrum werden zwischen NH-His und NH-Val sowie zwischen NH-Gly und NH-Ala die einzigen NH/NH-NOE Kontakte detektiert.

**Tabelle 3.2** Zusammenfassung der NH-Temperaturgradienten des cyclischen sekundären Amins **108** unter Angabe der chemischen Verschiebung bei 300 K in  $\text{DMSO-d}_6$ .

NH-Protonen	Gradient [ppb/K]	$^3J_{\text{NH}/\alpha}$ -Kopplung [Hz]
NH-Gly <sup>1</sup> (7.88 ppm)	4.1	5.8
NH-Ala <sup>3</sup> (8.70 ppm)	4.0	7.8
NH-Gly <sup>4</sup> (8.26 ppm)	4.5	6.5 / 3.5
NH-His <sup>5</sup> (8.44 ppm)	2.6	8.7
NH-Val <sup>6</sup> (7.18 ppm)	2.0	8.3
NH-Glu <sup>8</sup> (8.01 ppm)	3.8	8.6
NH-Tyr <sup>9</sup> (7.97 ppm)	6.8	7.6



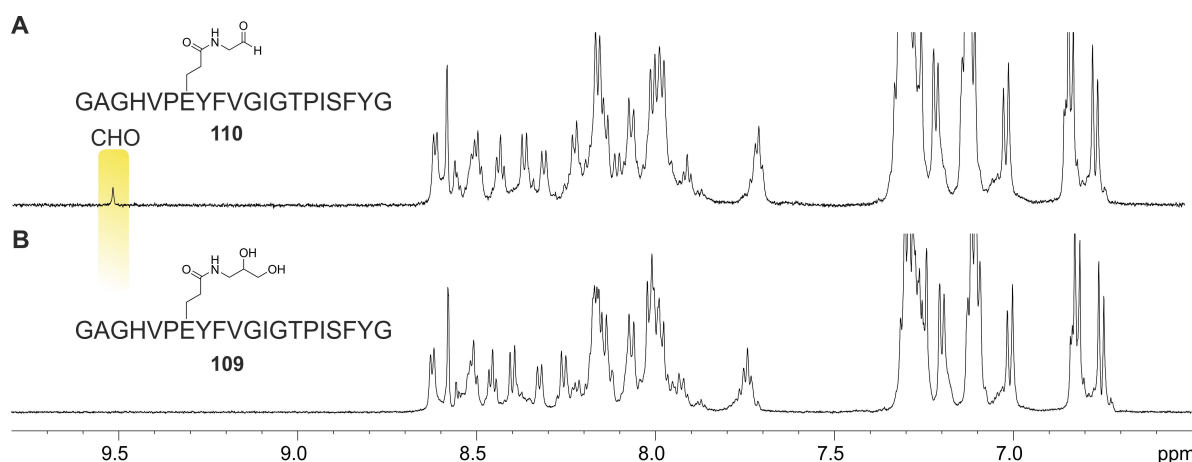
**Abbildung 3.30**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **106** und **108** (600 MHz, 300 K – 320 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) sowie dreidimensionale Darstellungen von **108**. **A)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des cyclischen Amins **108** nach reduktiver Aminierung mit  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  bei 320 K. **B)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des gleichen Peptids bei 300 K. Im Vergleich mit A) fällt auf, dass die NH-Signale eine geringe Abhängigkeit von der Temperatur aufweisen und Werte zwischen 2 und 7 ppb/K erhalten werden. Dieses spricht für die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken und einer geordneten Struktur. **C)**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des linearen Peptidaldehyds **106**, der im Vergleich mit der cyclischen Struktur keine ausgeprägte Dispersion im NH-Bereich aufweist und sehr flexibel ist. **D)** Dreidimensionale Darstellung des Peptidrückgrats von Peptid **108**. **E)** Vollständige dreidimensionale Darstellung des Peptids.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des linearen Peptidaldehyds **106** sowie der cyclischen, reduktiv aminierten Verbindung **108** sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Zu erkennen ist die erhöhte Dispersion der NH-Signale der cyclischen Verbindung. Basierend auf den NMR-Daten wurde eine dreidimensionale Struktur des Macrocyclus erstellt (siehe Abb. 3.30-D/E).

### 3.7 Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Aldehyden

Die vorgestellten Methoden der letzten Kapitel wurden im Rahmen der topologisch korrekten Synthese von Lassozeptiden am Beispiel des Microcins J25 bereits auf den N-terminalen Ring angewendet. Zusätzlich wurden die Methoden mit Microcin J25 durchgeführt und ihre Anwendbarkeit in Bezug auf die Synthese, Handhabbarkeit und NMR-spektroskopische Analyse der entstehenden Produkte untersucht. Es wurde eine Olefin-Mutante des Microcins sowie zwei Dipeptid-Mutanten synthetisiert, der Aldehyd freigesetzt und die reversible Cyclisierung via NMR-Spektroskopie analysiert. Im Fall der Insertion des Homoallylglycins in die native Microcin J25 Sequenz wurden keine Peptide mit einer definierten Struktur erhalten. Durch Zugabe von Kaliumosmat-Dihydrat und Natriumperiodat konnte das terminale Olefin quantitativ zum Aldehyd umgesetzt werden. Aufgrund der Überoxidation von funktionellen Gruppen verschlechterte sich die Qualität der Spektren sehr schnell, bis kein definierter Signalsatz mehr zu erkennen war. Der Versuch die reversible Cyclisierung zu analysieren, indem der pH-Wert auf 6.5 angehoben wurde, resultierte in stark durch H/D-Austausch verbreiterte Spektren, die nicht weiter analysiert werden konnten.

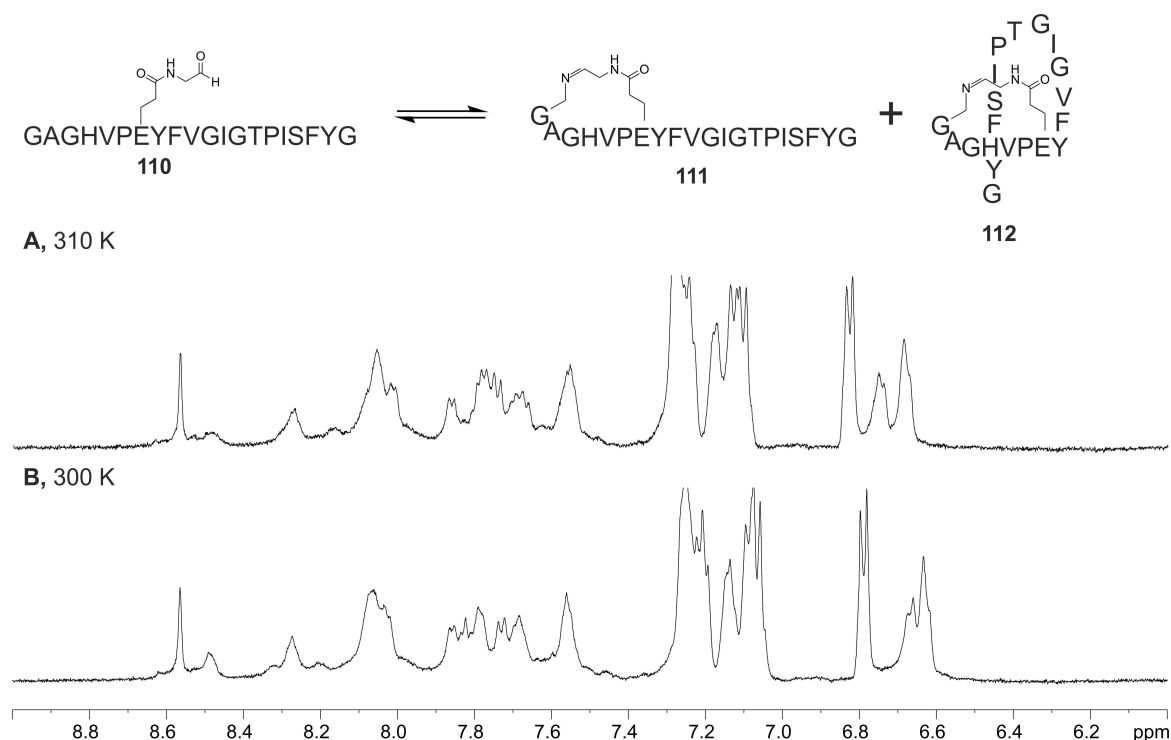
Die Synthese einer Microcin J25 Sequenz H-GAGHVPXYFVGIGTPISFYG-OH **109** (X = Glu[Gld]) mit der synthetisierten Dipeptid-Aminosäure Fmoc-Glu[Gld]-OH (**94**) konnte erfolgreich durchgeführt und der entsprechende Peptidaldehyd **110** durch Spaltung des terminalen Diols erhalten werden. In Abbildung 3.31 ist der NH-Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des terminalen Diols **109** sowie des entstehenden Aldehyds **110** gezeigt. Die Reaktion verläuft schnell, quantitativ und ohne eine weitere Oxidation von anwesenden funktionellen Gruppen.



**Abbildung 3.31** WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **109** und **110** (600 MHz, 300 – 320 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). **A**) Gezeigt ist der NH-Bereich des entstehenden Seitenketten-Aldehyds **110**, der durch die Natriumperiodat-vermittelte chemoselektive Diolsplaltung erzeugt wird. Das Signal des gebildeten Aldehyds bei 9.5 ppm ist gelb hervorgehoben und aufgrund der schnellen Reaktion zum entsprechenden Hydrat von verhältnismäßig geringer Intensität. **B**)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Microcin J25 Seitenketten-Diol Derivats **109**.

Die direkte Freisetzung des Seitenketten-Aldehyds **110** bei der Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte durch den Aminosäure-Baustein Fmoc-Glu[Gla]-OH (**100**), der im Kapitel 3.6.5 bereits eingeführt wurde.

Die reversible Cyclisierung von **110** wurde, wie bereits beschrieben, durch eine pH-Wert Änderung und durch die Variation der Temperatur analysiert. Durch die Erhöhung des pH-Werts von 3 auf 6.5 wird der Austausch von aciden Protonen begünstigt und es gehen viele Informationen besonders im NH-Bereich verloren. Der Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigt, dass kein spezifischer neuer Signalsatz, der eine Analogie zum nativen Microcin J25 aufweist, beobachtet werden kann. Eine schrittweise Erhöhung der Temperatur bei einem konstanten pH-Wert von 3 führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Signalsatz des topologisch korrekten Peptids **112**. Exemplarisch sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des in Phosphatpuffer bei pH 6.5 gelösten Peptidaldehyds **110** bei 300 und 310 K in Abbildung 3.32 dargestellt.

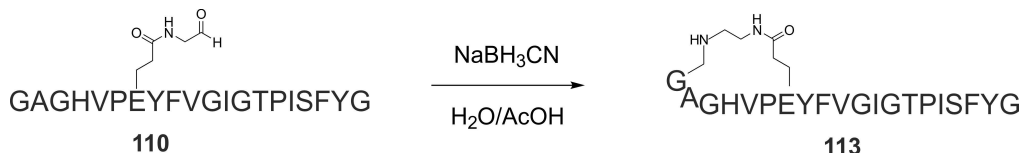


**Abbildung 3.32** Vergleich der beiden WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **110** (600 MHz, 300 – 320 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) bei pH 6.5. Durch die Temperaturerhöhung von 300 K auf 310 K, die den Ringschluss begünstigen sollte, findet keine beobachtbare Veränderung der Spektren, die auf einen topologisch korrekten Ringschluss **112** vermuten lässt, statt. Es ist ersichtlich, dass aufgrund des schnellen H/D-Austauschs kein definierter Signalsatz erhalten wird und eine Zuordnung der Signale nicht sinnvoll realisierbar ist.

Um die entstehenden macrocyclischen Imine **111** und **112** zu isolieren und zu analysieren wurde die Methode der reduktiven Aminierung des vorherigen Kapitels angewendet. Der Peptidaldehyd **110** wurde analog zu dem N-terminalen Ring mittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  reduktiv unter sauren Bedingungen aminiert und an Stelle des Imins wurde ein sekundäres Amin erhalten.

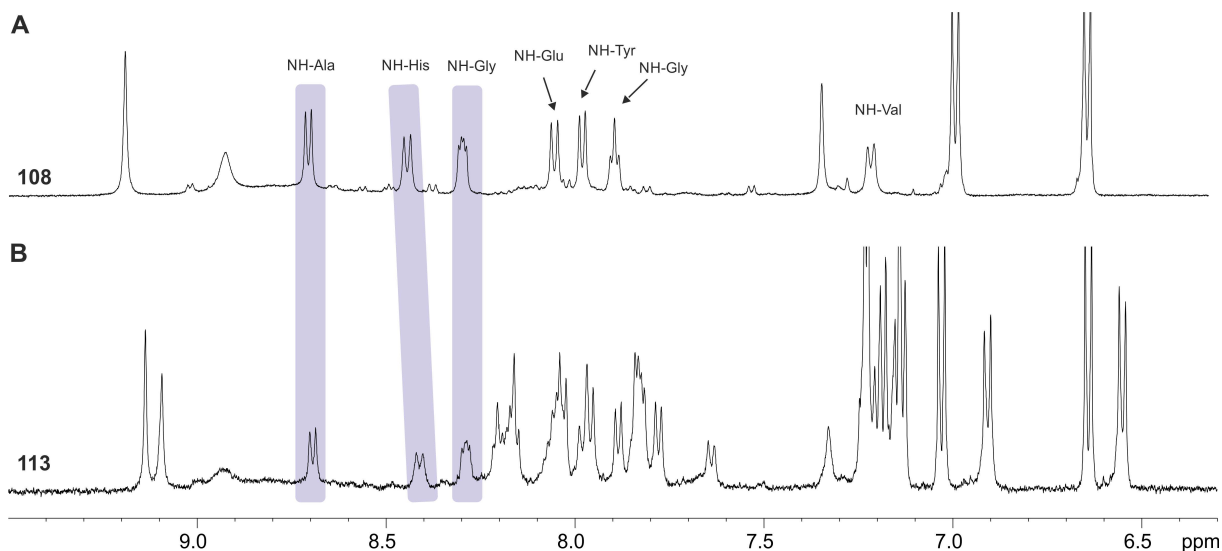


NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich der N-terminale Macrocyclus **113** vollständig gebildet hat und das C-terminale Ende des Peptids nicht eingefädelt wurde. Es liegt eine cyclisch-verzweigte Struktur vor, wie sie bereits im Rahmen von organisch-synthetischen Methoden erhalten wurde.



**Schema 3.31** Kovalente Fixierung des im Gleichgewicht gebildeten Imins durch selektive Reduzierung mittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in  $\text{H}_2\text{O/AcOH}$  (1:5) zum sekundären Amin **113**. Mittels 2D-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das Amin **113** keine Lasso-Topologie aufweist, sondern verzweigt cyclisch vorliegt.

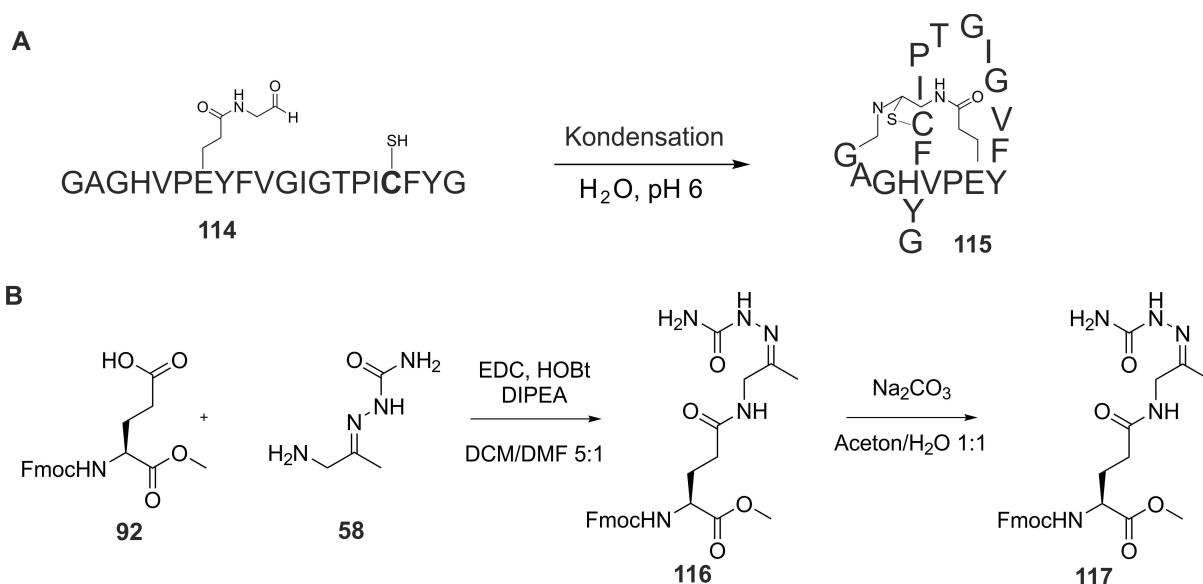
Dieses Syntheseprotokoll wurde im Bezug auf Lösungsmittel, Ionenkonzentration, Temperatur und Reduktionsmittel variiert. Die entstehenden macrocyclischen Peptide wurden mittels HPLC analysiert und stets die cyclisch-verzweigte Struktur erhalten. In Abbildung 3.33 ist ein Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des reaktiv aminierten N-terminalen Rings **108** aus Kapitel 3.6.6 mit der reaktiv aminierten vollständigen Sequenz **113** des Microcin J25 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die chemischen Verschiebungen des N-terminalen Rings in beiden Peptiden sehr ähnlich sind und im Fall des kompletten Microcins J25 das C-terminale Ende flexibel sowie außerhalb des Macrocyclus und nicht eingefädelt vorliegt. Dies ist an der Dispersion der amidischen Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sowie an den 2D-NMR-Spektren zu erkennen.



**Abbildung 3.33**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **108** und **113** (600 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ). **A)** Abbildung des NH-Bereichs des reaktiv aminierten Macrocyclus **108**, der im vorherigen Kapitel bereits eingeführt wurde. In blau markiert sind Aminosäuren, die im Spektrum des kompletten Microcin J25 Derivats **113** zu erkennen sind. Die weiteren amidischen Protonen des N-terminalen Macrocyclus sind in der kompletten Sequenz von den amidischen Protonen des C-terminalen Endes überlagert. **B)** Ausschnitt des NH-Bereichs der kompletten Sequenz des Microcins J25 Derivats **113** als sekundäres Amin.

### 3.7.1 Alternative Cyclisierung von Microcin J25 Aldehyden

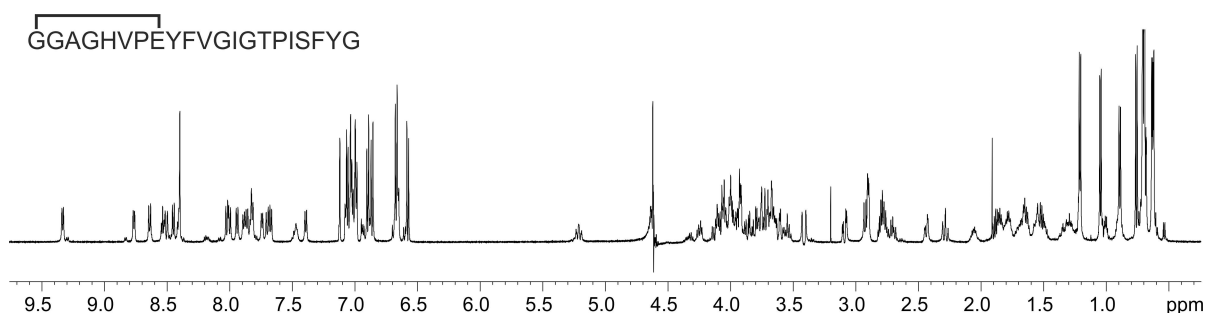
In einem weiteren synthetischen Ansatz wurde Ser<sup>18</sup> gegen ein Cys substituiert und die Bildung eines bicyclischen *S,N*-Acetals **115**, bestehend aus dem Seitenketten-Aldehyd, dem N-terminalen Gly sowie dem Thiol des zusätzlichen Cys<sup>18</sup>, analysiert. Bereits die Untersuchung des Peptids mittels HPLC zeigte eine höchst unselektive Reaktion, die zu einer Vielzahl an Verbindungen, welche nicht erfolgreich aufgereinigt werden konnten, führte. Die hohe Nucleophilie des Thiols führte zu einem Scheitern dieser Strategie (siehe Abb. 3.34-A). Aufgrund der schnellen Hydrolyse der Imin-Peptide wurde analog zu Kapitel 3.4.1 das Dipeptid **116** entwickelt, das in der Seitenkette kein Aldehyd sondern ein Keton aufweist. Das Seitenketten-Keton kann mit einem N-terminalen Hydroxylamin das entsprechende Ketoxim bilden. Die Synthese des geeigneten Bausteins **117** konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Keton-Schutzgruppe nicht erfolgreich durchgeführt werden. Der Einbau einer Seitenketten-ungeschützten Aminosäure führte zur entsprechenden Deletionsmutante (siehe Abb. 3.34-B).



**Abbildung 3.34** Darstellung von zwei alternativen Syntheserouten, die mittels Carbonyl-Chemie die Synthese von eingefädelten Microcin J25 Derivaten ermöglichen sollten. **A)** Durch Substitution des Ser<sup>18</sup> gegen ein Cys in Peptid **114** wurde die Bildung des *S,N*-Acetals **115** analysiert. **B)** Die Kombination der Dipeptid-Strategie aus Kapitel 3.6.5 mit dem geschützten Aminoacetone **58** sollte die Cyclisierung über eine Ketoxim-Einheit ermöglichen. Bereits die Synthese, des in der Festphasensynthese einsetzbaren Bausteins **117**, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Beide alternative Synthesen führten nicht zum gewünschten Topoisomer.

### 3.8 Optimierung der Löslichkeit von Microcin J25 Peptiden

Die im vorherigen Kapitel bereits beschriebenen Löslichkeitsprobleme von Lassozeptiden in wässrigem Phosphatpuffer sind im Fall des Microcins J25 literaturbekannt und werden durch Verwenden von organischen Lösungsmittel umgangen. Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung werden die Verbindungen meist in  $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}_{\text{d}3}$  oder  $\text{DMSO}_{\text{d}6}$  gelöst und vermessen.<sup>[128,130,143,164,326]</sup> NMR-Spektren von Microcin J25 (**118**) in wässrigem Phosphat-Puffer wurden noch nicht gemessen bzw. publiziert. Mit nativem Microcin J25, das biosynthetisch im Arbeitskreis MARAHIEL (PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG) hergestellt und uns zur Verfügung gestellt wurde, konnten Untersuchungen zur Löslichkeit der Verbindung in wässrigem Phosphat-Puffer durchgeführt werden. Bei pH 3 lassen sich bis zu 2 mg des Lassozeptids vollständig in 500  $\mu\text{L}$  Volumen lösen und NMR-spektroskopisch analysieren, ohne dass die Verbindung während der Messungen ausfällt. Sobald der pH-Wert in Richtung des neutralen Bereichs angehoben wird, verringert sich die Löslichkeit und das Peptid flockt aus der Lösung aus. In Abbildung 3.35 ist das entsprechende  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei pH 3 gezeigt. Die gleichen Eigenschaften weist auch lineares Microcin J25 auf.



**Abbildung 3.35** WATERGATE- $^1\text{H}$ -NMR von **118** (600 MHz, 300 K,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  5:1,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Das Spektrum zeigt die charakteristischen Signale der stark entschirmten Aminosäure Tyr<sup>20</sup>, die sich im Macrocyclus befindet, bei 9.33 ppm (NH) und bei 5.21 ppm ( $\alpha\text{H}$ ). Mit Hilfe dieser Signale lässt sich schnell und einfach bestimmen ob ein Microcin J25 Derivat eingefädelt vorliegt oder nicht. Im Vergleich mit den NMR-Spektren in Methanol oder DMSO unterscheiden sich die Signale aufgrund der unterschiedlichen Solvatation um bis zu 0.6 ppm (im NH-Bereich).

Zur besseren Löslichkeit von linearen Microcin J25 Derivaten wurden unterschiedliche Methoden angewendet. Ein in der Arbeitsgruppe bekanntes und erfolgreiches Verfahren ist die C-terminale Elongation des Peptids mit einem Lysin-Dipeptid und Aminohexansäure als Spacer.<sup>[327]</sup> Als zweite Variante wurde die von KNAPPE et al. entwickelte Integrin-bindende RGD-Mutante synthetisiert und hinsichtlich ihrer Löslichkeit analysiert.<sup>[144]</sup> In der letzten Synthese wurde eine Mutante dargestellt, die ebenfalls im Bereich der *turn*-Region (Gly<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-Gly<sup>14</sup>) Aminosäuren mit einer höheren Polarität aufweist.

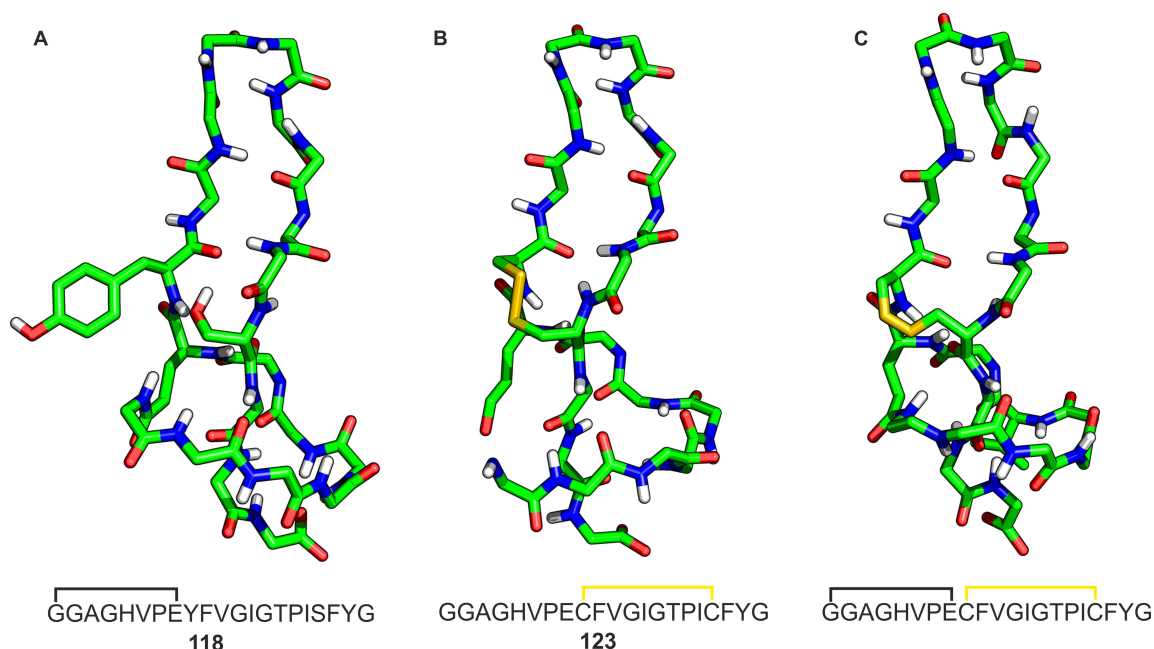
**Tabelle 3.3** Übersicht der synthetisierten Peptide zur Verbesserung der Löslichkeit in H<sub>2</sub>O bei pH 7. An erster Stelle gezeigt sind das native Microcin J25 (**118**) sowie dessen lineares Derivat **119**. Hervorgehoben sind nachfolgend die hinzugefügten/mutierten Aminosäuren, welche die Gesamtpolarität des Peptids erhöhen sollen (X = Ahx). Die Löslichkeit konnte nur durch C-terminale Elongation mit Lysinen in Peptid **120** deutlich verbessert werden. Die Mutationen in der *turn*-Region brachte keine nennenswerte Verbesserung der Löslichkeit (Peptide **121** und **122**). Die Struktur der Peptide ist verglichen mit nativem Microcin J25 gering ausgeprägt. Dies wird anhand der NH-Dispersion verdeutlicht.

Peptidsequenz	Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	Dispersion (NH-Bereich)
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG ( <b>118</b> )	schlecht	1.95 ppm (Lasso)
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG ( <b>119</b> )	schlecht	0.93 ppm (offenkettig)
GGAGHVPEYFVGIGTPISFY <b>XXKKG</b> ( <b>120</b> )	sehr gut	1.19 ppm
GGAGHVPEYFVR <b>GD</b> TPISFYG ( <b>121</b> )	mittel	1.35 ppm
GGAGHVPEYF <b>KfG</b> EPVSFYG ( <b>122</b> )	gering	0.83 ppm

In Tabelle 3.3 sind natives **118** und offenkettiges Microcin J25 **119** sowie alle drei synthetisch modifizierte Peptide (**120** – **122**) aufgeführt, die Mutationspositionen hervorgehoben und deren Eigenschaften zusammengefasst. Verglichen mit dem nativen Lassozeptid **118** zeigten alle drei synthetischen Derivate eine verbesserte Löslichkeit in H<sub>2</sub>O bei pH 7. Durch Verlängerung des Peptids mit Ahx-Lys-Lys in **120** wurde die beste Löslichkeit erreicht, aber durch die starke Veränderung der C-terminalen, im nativen Peptid eingefädelten Sequenz konnte das Peptid für weitere Experimente nicht in Betracht gezogen werden. Die Integrin-bindende RGD-Mutante **121** zeigte eine ausreichende Löslichkeit der Substanz sowie die höchste NH-Dispersion (1.35 ppm) der offenkettigen Peptide. Die Mutante **122** wies eine schlechte Dispersion der amidischen Protonen sowie eine geringe Löslichkeit auf. Trotz der leicht verbesserten Löslichkeit der modifizierten Peptide wurde eine dauerhafte Änderung der Primärsequenz nicht übernommen.

### 3.9 Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Disulfiden

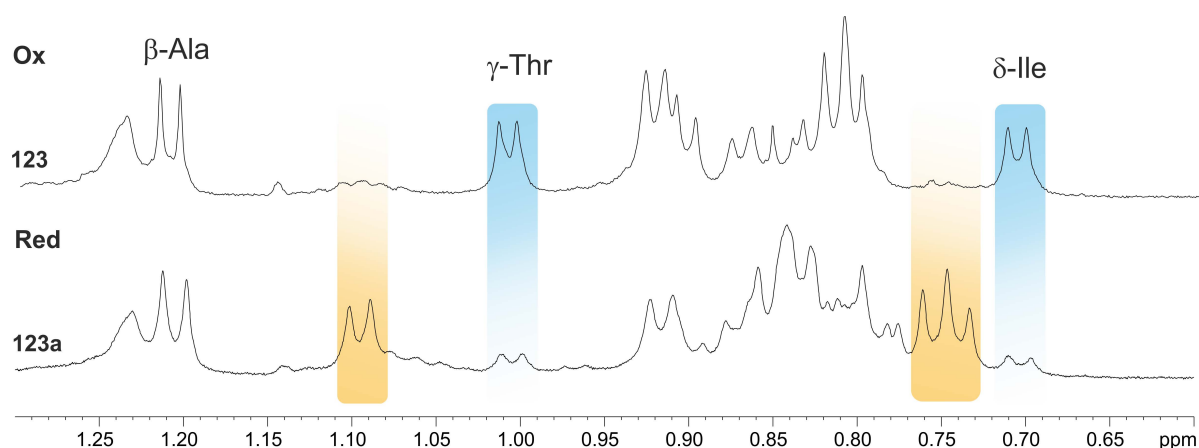
Die angewendete reversible Cyclisierung in wässrigem Phosphat-Puffer führte nicht zu dem korrekt eingefädelten Lassopeptid. Die intramolekularen Kräfte reichen nicht aus, um die Vorfaltung des linearen Peptids zu nutzen und das eingefädelte Lassopeptid im Gleichgewicht mit der offenkettigen oder nicht eingefädelten Struktur NMR-spektroskopisch zu beobachten und den Cyclisierungsprozess zu analysieren. Die Struktur des Microcin J25, die in Lösung eingenommen wird, von ROSENGREN et al. postuliert wurde und auf dem PDB-Code 1Q71 basiert, dient als Grundlage für synthetische Ansätze, um das  $\beta$ -Faltblatt kovalent zu fixieren.<sup>[129]</sup> Das  $\beta$ -Faltblatt inklusive des  $\beta$ -turns, wird von den Aminosäuren Tyr<sup>9</sup> bis Ser<sup>18</sup> ausgebildet und sollte kovalent über eine Brücke, die leicht chemo- sowie regioselektiv geschlossen und geöffnet werden kann, fixiert werden. Es sollte eine Vorfaltung induziert und die korrekte Einfädelung ermöglicht werden (siehe Abb. 3.36).



**Abbildung 3.36** A) Energieminimierte Durchschnittskonformationen des Microcins J25 **118**. Gezeigt ist jeweils das Peptid-Rückgrat mit den amidischen Protonen sowie die Seitenketten der Aminosäuren Tyr<sup>9</sup> und Ser<sup>18</sup>. Dargestellt ist die NMR-basierte Struktur von ROSENGREN et al. (PDB-Code 1Q71).<sup>[129]</sup> Die zwei weiteren Strukturen B und C basieren auf dieser und wurden nur minimal verändert. B) In der mittleren Struktur wird die Mutation der Aminosäuren Tyr und Ser durch zwei Cys und dem dementsprechenden Disulfid **123** verdeutlicht. Der Macrolactamring ist noch offen und verdeutlicht die gewollte Vororientierung zum korrekt eingefädelten Lasso. C) Das hypothetische, bicyclische Peptid rechts ist die Kombination aus beiden vorherigen Strukturen.

Diese Art von kovalenter Fixierung wird in der synthetischen und biologischen Peptidsynthese bereits in Form von Disulfidbrücken erfolgreich angewendet. Es können  $\beta$ -Faltblätter,  $\beta$ - und  $\gamma$ -turns sowie ganze Tertiärstrukturen, beispielsweise im Rahmen der Conotoxine, stabilisiert und fixiert werden.<sup>[328–331]</sup> Zusätzlich können Disulfid-Brücken die pharmakologischen Eigenschaften von Peptiden entscheidend verbessern.

Sie dienen zur Verbesserung der Stabilität gegenüber Proteasen und führen zu erhöhter Selektivität sowie Aktivität.<sup>[85,332]</sup> Der besondere Vorteil an Disulfidbrücken ist die einfache Synthese geeigneter Peptidvorläufer, die durch direkte Sauerstoff-Oxidation zur Disulfidbrücke reagieren. Es muss eine geeignete Stelle im Peptid ermittelt werden, an der die Cystein-Mutation durchgeführt werden kann. Im Microcin J25 wurden, basierend auf der Struktur in Lösung, das Ser<sup>18</sup> sowie das Tyr<sup>9</sup> ausgewählt. Die Substitution des Sauerstoffs gegen den Schwefel in der Ser<sup>18</sup>-Mutation verändert die native Sequenz nur unwesentlich, wogegen die Mutation des Tyrosins einen starken Eingriff in die Seitenketten-Struktur darstellt. Die Synthese des Peptids S<sup>9</sup>,S<sup>18</sup>-cyclo-GGAGHVPECFVGIGTPICFYG-OH (**123**) erfolgte analog zu den bisher dargestellten Peptiden mit Fmoc-Cys(Trt)-OH. Die Seitenketten-Schutzgruppe des Cysteins wurde säurekatalytisch abgespalten und das Rohpeptid nach Abspaltung vom Harz in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer bei pH 7.4 durch Luftsauerstoff oxidiert (für weitere Details siehe Kapitel 6.2.6). Das erhaltene disulfidverbrückte Peptid **123** wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die erfolgreiche Oxidation der Cysteine zur Disulfidbrücke wurde mittels HSQC-Spektren belegt. Die reduzierte und oxidierte Form der Cysteine weisen eine unterschiedliche Verschiebung der  $\beta$ -Kohlenstoffatome der Seitenkette auf. Diese liegt im Fall der Thiol-Gruppe bei ca. 25 ppm und verschiebt sich durch die Oxidation um ca. 20 ppm tieffeldig.<sup>[333–336]</sup> Bereits die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung der reduzierten Spezies H-GGAGHVPECFVGIGTPICFYG-OH **123a** zeigt einen kleinen zusätzlichen Signalsatz, welcher der bereits oxidierten Form **123** zugeordnet werden kann. Dies und die quantitative Oxidation verdeutlichen die passende Ringgröße des entstehenden Disulfids (siehe Abb. 3.37).



**Abbildung 3.37** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (600 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K) des Alkylbereichs von 1.30 bis 0.60 ppm. **Red** (unten) zeigt das reduzierte Peptid **123a**, das nach Abspaltung des Peptids vom Harz erhalten wurde. Durch DMSO als Lösungsmittel und der Lyophilisierung des Peptids wurde bereits ein geringer Teil oxidiert. In orange markiert sind die Alkylsignale, die im Laufe der Oxidation in den neuen Signalsatz (blau) transformiert werden. **Ox** (oben) zeigt das vollständig oxidierte Peptid **123** und die entstehenden neuen Signale Thr und Ile sind in blau hervorgehoben.

Anhand der fehlenden Dispersion des NH-Bereichs von **123** im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wird ersichtlich, dass keine stabile Struktur erhalten wird. Eine absolut sichere Zuordnung ist aufgrund der Signalüberlappung nicht möglich. Lediglich die Alkylgruppen der Aminosäuren in der *turn*-Region (Thr, Ile und Val) können eindeutig zugeordnet werden und zeigen eine starke Änderung der chemischen Verschiebung im Rahmen der Disulfidverbrückung und eine akzeptable Dispersion (siehe Abb. 3.37).

Das Peptid  $\text{S}^9, \text{S}^{18}$ -cyclo-GGAGHVPECFVGIGTPICFYG-OH (**123**) weist mit dem C-terminalen Gly<sup>21</sup> und der Seitenkette des Glu<sup>8</sup> zwei Carboxylgruppen auf, die in der folgenden Macrocyklisierung aktiviert und von dem N-terminalen Glycin nucleophil angegriffen werden können. Zur Analyse der Macrocyklisierung wurde das Peptid unter verschiedenen Bedingungen aktiviert und der nucleophile Angriff des N-terminalen Glycins analysiert. Als Experimente wurden Standardmethoden wie die Kupplung in DMF mit HBTU/HOBt oder DPPA/ $\text{NaHCO}_3$  sowie Kupplungsbedingungen in wässrigem Phosphatpuffer bei pH 7 mit EDC durchgeführt. Die Reaktionen in denaturierenden Lösungsmitteln wie DMF führten zu keinem nachweisbaren cyclischen Produkt. Bei der Verwendung von Phosphat-Puffer als Lösungsmittel konnte eine neue Verbindung HPLC-chromatographisch nachgewiesen, aber durch die schlechte Löslichkeit des Peptids nicht isoliert und identifiziert werden. In NMR-basierten Experimenten zur Macrocyklisierung konnten keine neuen Signalsätze detektiert werden. Durch selektive Schützung der Seitenketten-Carboxylgruppe des Glu<sup>8</sup> als Allylester im Peptid H-GGAGHVPE(**Allyl**)CFVGIGTPICFYG-Harz (**124**) sollte auf der festen Phase die chemoselektive Entschützung der Carboxylgruppe erfolgen. Die nachfolgende DIC/Oxyma-vermittelte Macrocyklisierung sollte unter Mikrowellen-Unterstützung durchgeführt werden, um abschließend das Disulfid in Lösung zu bilden. NMR-spektroskopische Analysen konnten jedoch zeigen, dass es unter diversen Bedingungen nicht möglich war den Allylester **124** erfolgreich zu spalten und nur das Allyl-geschützte Disulfid **124a** erhalten wurde.

Die in Kapitel 3.7 vorgestellte Methode zur reversiblen Cyclisierung des Microcin J25 Aldehyds **110** wurde mit der in diesem Kapitel eingeführten Vorfaltung des Peptidrückgrats über eine Disulfidbrücke verbunden. Es konnte das entsprechende Disulfid mit der Acetal-geschützten Aminosäure synthetisiert werden, indem das vollständig geschützte Peptid H-GGAGHVPXCFVGIGTPICFYG-OH (**125**, X = Glu[Gla]) von der festen Phase mit HFIP/DCM (4:1) in 30 min abgespalten wurde. Das Disulfid konnte mit äquimolaren Mengen Iod in HFIP/MeOH (5:1) gebildet werden. Die anschließende Freisetzung des Seitenkettenaldehyds konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Disulfidbrücke ist zu nucleophil

und greift unter Addition am Carbonyl-Kohlenstoffatom an. Um ein *shuffling* des Disulfids zu vermeiden und die Reaktivität des Disulfids zu verringern muss ein bestimmter pH-Wert-Bereich zwischen 2–5 eingehalten werden. Die Halbwertszeit des Zerfalls einer Disulfidbrücke beträgt unter dem in dieser Arbeit meist verwendeten Phosphat-Puffer (pH 3, 50 mM) über 500 h.<sup>[337]</sup> Daher wurde zusätzlich versucht den entstehenden Aldehyd direkt reduktiv mit NaBH<sub>3</sub>CN zu aminieren. Es konnte aber erneut nicht das gewünschte Produkt isoliert werden.

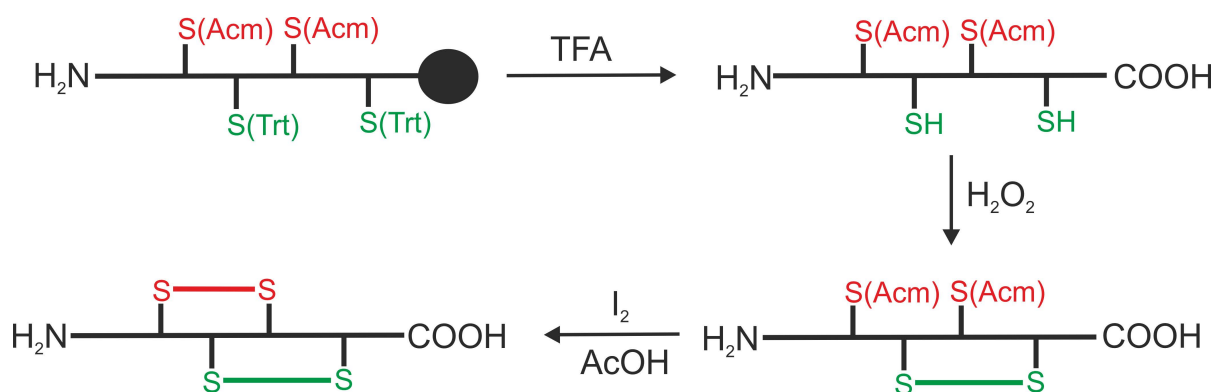
Eine weitere Möglichkeit zur Cyclisierung des N-terminalen Cyclus ist die jeweilige Substitution von Gly<sup>1</sup> und Glu<sup>8</sup> gegen Cys. Durch Bildung der entsprechenden Disulfidbrücke wird ein Macrocyclus erhalten, der die gleiche Anzahl an Atomen aufweist wie der Cyclus im nativen Microcin J25. Im folgenden Kapitel wird die Synthese und Untersuchung solcher einfachen und zweifachen Disulfid-Systeme zusammengefasst.



### 3.10 Synthese und Cyclisierung von Microcin J25 Tetrasulfiden

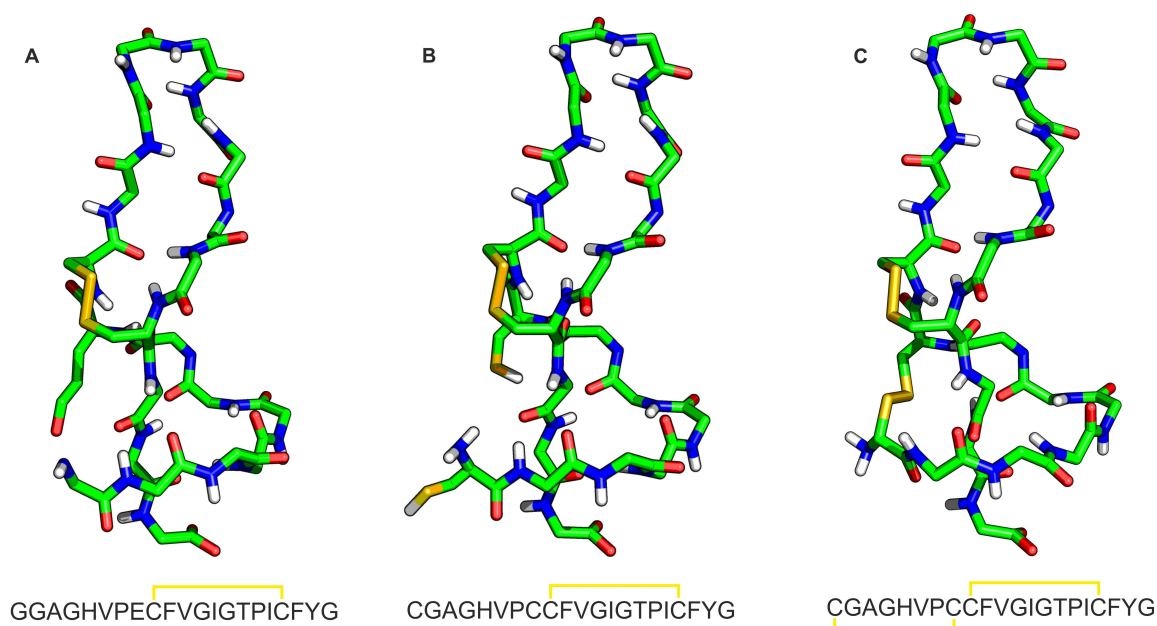
#### 3.10.1 Synthesestrategien von zweifach disulfidverbrückten Peptiden

In einigen Fällen können vier Cysteine regioselektiv in einem Eintopf-Verfahren zu einem einheitlichen Produkt oxidiert werden (siehe Kap. 3.14.2). Dies sind Peptide wie  $\alpha$ -Defensine, Apamin, Protegrin oder Sarafotoxin, die eine sehr stabile Struktur aufweisen und über Vorzugskonformationen nur bestimmte Disulfidbrücken ermöglichen, anstatt eine Mischung aus den drei möglichen topologischen Isomeren zu bilden.<sup>[54,338–340]</sup> Bei Peptiden, die keine Vorzugskonformation aufweisen, kann die Bildung von mehreren Disulfidbrücken nicht regioselektiv erfolgen. Die gerichtete Synthese solcher Strukturen muss schrittweise durchgeführt werden und erfordert die Schützung der Thiol-Gruppen, die nicht reagieren sollen. Es wurden zahlreiche Cystein Seitenketten-Schutzgruppen entwickelt. Die am häufigsten angewendeten sind Trt, Acm, Mob und Mmt.<sup>[341–346]</sup> Zur regioselektiven Synthese von Peptiden mit zwei Disulfidbrücken sind diverse Syntheseprotokolle entwickelt worden. Meist wird ein Protokoll bestehend aus jeweils zwei Trt-geschützten und Acm-geschützten Cysteinen verwendet.<sup>[346–350]</sup> Die Abspaltung der Trt-Schutzgruppen erfolgt während globaler Entschützungen des Peptids und Abspaltung vom Harz mit einer gängigen Abspaltlösung wie TFA/Phenol/H<sub>2</sub>O/TIPS (88:5:5:), bei der die Acm-Schutzgruppe erhalten bleibt. Die oxidative Bildung der Disulfidbrücke erfolgt in wässrigem Phosphat-Puffer im basischen Milieu durch Luftsauerstoff oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0.3%ig). Das erhaltene Peptid kann aufgereinigt, analysiert und gelagert werden. Zur Bildung der zweiten Disulfidbrücke wird das Peptid in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/AcOH (5:1) gelöst und mit einem Überschuss an elementarem Iod versetzt. Es erfolgt eine oxidative Abspaltung der Acm-Schutzgruppen und eine simultane Oxidation zum Disulfid. Diese Reaktionen lassen sich präzise und mittels HPLC-Chromatographie verfolgen (siehe Abb. 3.38).



**Abbildung 3.38** Protokoll zur Synthese regioselektiv gebildeter Disulfidbrücken durch Wahl einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie. Trt-geschützte Thiole können selektiv in Gegenwart von Acm-Schutzgruppen entschützt und mittels Luftsauerstoff/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert werden. Die simultane Abspaltung der Acm-Schutzgruppe und Oxidation der Cysteine erfolgt mit einem Überschuss an Iod in H<sub>2</sub>O/AcOH (5:1).<sup>[346–350]</sup>

Weitere Angaben zur Synthese sind in Kapitel 6.2.6 aufgeführt. Peptide mit sechs Cysteinen, die zu drei Disulfidbrücken vernetzt werden können, werden über eine erweiterbare Schutzgruppenstrategie mit den Schutzgruppen Trt, Ac und Mob regioselektiv synthetisiert.<sup>[351]</sup> Aufgrund der langwierigen und komplexen Synthese ist es in bestimmten Fällen, wenn das Peptid ein natürliches Disulfidmuster oder Teil eines solchen Musters darstellt, sinnvoller eine simultane Disulfidbildung ohne zusätzliche Schutzgruppen durchzuführen.<sup>[340,352]</sup> Zur Synthese von zweifach disulfidverbrückten Microcin J25 Derivaten wurden zusätzlich zu Tyr<sup>9</sup> und Ser<sup>18</sup> die Aminosäuren Gly<sup>1</sup> und Glu<sup>8</sup> des Peptids **123** gegen orthogonal geschützte Cysteine substituiert (siehe Abb. 3.39).

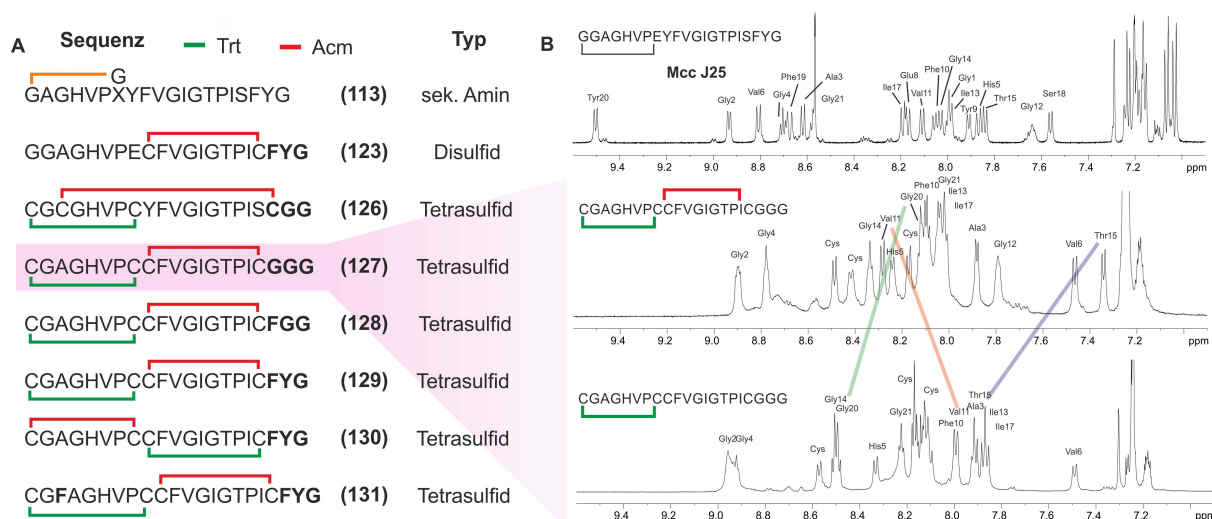


**Abbildung 3.39** Energieminimierte Durchschnittskonformationen der Microcin J25 Cystein-Mutanten **A-C** basierend auf der Struktur des PDB-Codes 1Q71.<sup>[129]</sup> **A)** Gezeigt ist das bereits in Kapitel 3.9 eingeführte Disulfid als offener Lactamring. **B)** In der Mitte dargestellt ist die Gly<sup>1</sup> und Glu<sup>8</sup> zu Cys Mutation, die im Rahmen einer Disulfidbrücke zur Macrocyclisierung führen soll. Die reduzierte Form soll abschließend oxidiert werden, die in **C)** eingenommene Topologie analysiert und mittels *disulfide-shuffling* der Disulfidbrücke auf ihre Stabilität hin untersucht werden. Die Synthese erfolgt über orthogonal geschützte Cysteine mit Trt/Ac-Schutzgruppen.

Durch die Substitutionen konnten Microcin J25 Derivate synthetisiert werden, die vier Cysteine aufweisen, die unterschiedlich und orthogonal mit Trt/Ac-geschützt eingesetzt wurden. Die synthetisierten Peptide wurden nach dem vorgestellten Protokoll (siehe Abb. 3.38) regioselektiv oxidiert und charakterisiert. Im folgenden Kapitel werden die synthetischen Di- und Tetrasulfide NMR-spektroskopisch verglichen und deren Struktur analysiert.

### 3.10.2 Unterschiede zwischen Di- und Tetrasulfiden

Zur korrekten Vorfaltung von Microcin J25 und der Cyclisierung der eingefädelten Lasso-Topologie wurde mittels einer Disulfidbrücke das C-terminale Peptidende in der Nähe des N-Terminus kovalent fixiert. Eine nachfolgende irreversible Lactamisierung oder reversible Imin-Bildung konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Anstelle der Imin-Bindung wurde durch ein zweites Disulfid der N-terminalen Ring reversibel gebildet. Die im Rahmen dieser Experimente synthetisierten Peptide und deren Verknüpfungsarten sind in Abbildung 3.40-A aufgelistet. In grün dargestellt sind Disulfide, die auf Trt-geschützten Cysteinen basieren und durch Luftsauerstoff zur ersten Disulfidbrücke oxidiert wurden. Die nachfolgend gebildete Disulfidbrücke in rot wurde durch oxidative Abspaltung der Acm-Schutzgruppen mit elementarem Iod in AcOH/H<sub>2</sub>O synthetisiert. In Abbildung 3.40-B ist beispielhaft das Acm-geschützte Disulfid des Peptids **127** (unten), sowie das Tetrasulfid (mittig) und das native Microcin J25 **118** (oben) zum Vergleich dargestellt. Es ist zu erkennen, dass zunächst der N-terminale Ring geschlossen und anschließend das C-terminale Ende an das Peptidrückgrat kovalent gebunden wurde. Dies verhindert die Einfädelung der sterisch-anspruchsvollen Seitenketten von Phenylalanin und Tyrosin des C-terminalen Endes, weshalb in einigen Microcin Derivaten diese vollständig oder teilweise gegen Glycin substituiert wurden, um eine korrekte Faltung bzw. die Einfädelung zu ermöglichen.



**Abbildung 3.40 A)** Auflistung der synthetisierten Di- und Tetrasulfide. Dargestellt sind die jeweilige Sequenz, die vorherige Schutzgruppe der oxidierten Cysteine und der Verknüpfungstyp innerhalb des Peptids. In grün dargestellt sind die zuerst gebildeten Disulfide, gefolgt von der rot markierten Disulfidbrücke. **B)** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des NH-Bereichs (600 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>). Am Beispiel des Peptids **127** ist der strukturelle Einfluss des zuletzt gebildeten Disulfids verdeutlicht. Unten gezeigt ist das Acm-geschützte Disulfid und in der Mitte dargestellt ist das doppelte Disulfid-Peptid. Zu erkennen ist die Änderung der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen Val<sup>11</sup>, Gly<sup>14</sup> und Thr<sup>15</sup> im Bereich des β-turns. Zum Vergleich ist der NH-Bereich des nativen Microcin J25 **118** dargestellt (oben).

Die Änderung der chemischen Verschiebung der markierten NH-Protonen von **127** im mittleren Spektrum der Abbildung 3.40-B verdeutlicht den strukturellen Einfluss, der aufgrund der zweiten gebildeten Disulfidbrücke zu erwarten ist. Besonders die amidischen Protonen des Val<sup>11</sup> und Thr<sup>15</sup> weisen durch die entstehende *turn*-artige Struktur eine starke Änderung der chemischen Verschiebung auf. In der Löslichkeit unterscheiden sich die einfachen und zweifachen Disulfide gering. Die Disulfidbildung vom Rohpeptid über das Disulfid bis hin zum Tetrasulfid wurde mittels HPLC verfolgt und die erhaltenen Retentionszeiten sind in der Tabelle 3.4 für sämtliche Peptide aufgeführt.

**Tabelle 3.4** Übersicht der synthetisierten Peptide als Di- und Tetrasulfide sowie deren, mittels HPLC bestimmten, Retentionszeiten. Die Retentionszeiten basieren auf HPLC-Messungen mit 10% - 90% MeCN in 20 min und einem Durchfluss von 0.42 mL/min. \* Die Disulfidbrücken wurden in umgekehrter Reihenfolge gebildet.

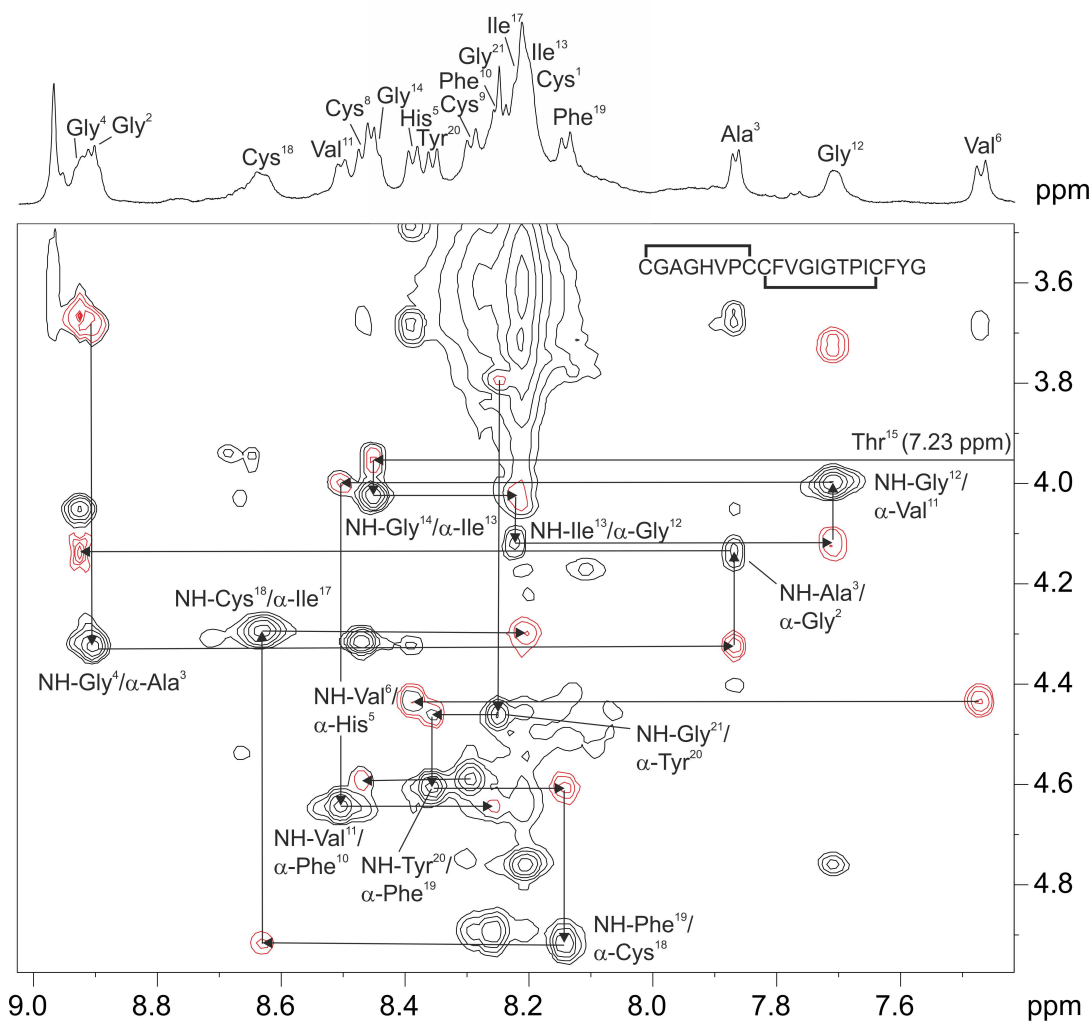
Peptidsequenz	$t_R$ (S <sup>A</sup> ,S <sup>B</sup> ) [min]	$t_R$ (S <sup>A</sup> ,S <sup>B</sup> :S <sup>C</sup> ,S <sup>D</sup> ) [min]
S <sup>9</sup> ,S <sup>18</sup> -cyclo-GGAGHVPECFVGIGTPICFYG ( <b>123</b> )	9.84	–
S <sup>1</sup> ,S <sup>8</sup> :S <sup>3</sup> ,S <sup>19</sup> -bicyclo-CGCGHVPCYFVGIGTPISCGG ( <b>126</b> )	9.74	10.80
S <sup>1</sup> ,S <sup>8</sup> :S <sup>9</sup> ,S <sup>18</sup> -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICGGG ( <b>127</b> )	9.64	11.71
S <sup>1</sup> ,S <sup>8</sup> :S <sup>9</sup> ,S <sup>18</sup> -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFGG ( <b>128</b> )	9.20	10.43
S <sup>1</sup> ,S <sup>8</sup> :S <sup>9</sup> ,S <sup>18</sup> -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFYG ( <b>129</b> )	9.73	10.63
S <sup>1</sup> ,S <sup>8</sup> :S <sup>9</sup> ,S <sup>18</sup> -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFYG* ( <b>130</b> )	9.65	10.31
S <sup>1</sup> ,S <sup>9</sup> :S <sup>10</sup> ,S <sup>19</sup> -bicyclo-CGFAGHVPCCFVGIGTPICFYG ( <b>131</b> )	10.34	11.56

Die gemessenen Retentionszeiten der Di- und Tetrasulfide sind sich sehr ähnlich. Lediglich die Insertion eines zusätzlichen Phenylalanins in den N-terminalen Macrocyclus verringert, wie erwartet, die Polarität. Durch die Bildung der Disulfidbrücken in umgekehrter Reihenfolge, wie im Fall der Peptide **129** und **130** in Tabelle 3.4, verändert sich interessanterweise die Retentionszeit, wodurch auf eine unterschiedliche Polarität der Peptide geschlossen werden kann. Ein möglicher Grund dafür könnte eine unterschiedliche Topologie der Peptide sein, die auf der inversen Cyclisierung basiert. In den folgenden Kapiteln werden mittels NMR-Spektroskopie die Strukturen der Di- und Tetrasulfide genauer analysiert.

### 3.11 NMR-Strukturanalyse der Microcin J25 Tetrasulfide

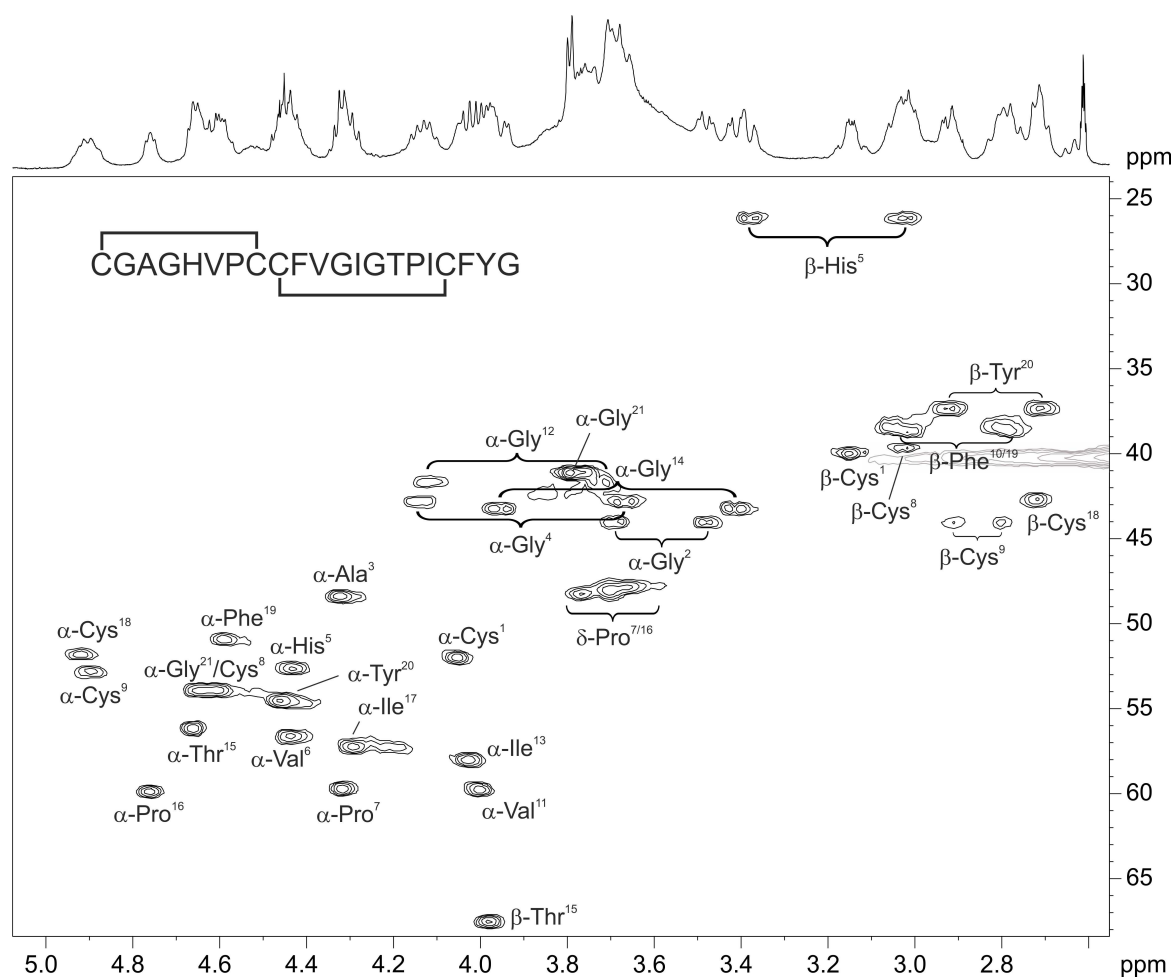
#### 3.11.1 Zuordnung der Signale des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums für die Strukturaufklärung

Basierend auf den im vorherigen Kapitel thematisierten NMR-Spektren der Tetrasulfid-Peptide wurde zunächst eine Signalzuordnung mittels 2D-NMR-Experimenten durchgeführt, das am Beispiel des Peptids **129** verdeutlicht wird. In Abbildung 3.41 ist die Sequenzierung des Peptids in Richtung des N-Terminus im Rahmen eines NH- $\alpha$ -walks dargestellt, wodurch die Primärstruktur der Verbindung bestätigt werden kann. Unterbrochen wird die Sequenzierung bei Pro<sup>7</sup> und Pro<sup>16</sup> aufgrund des fehlenden amidischen Protons sowie bei den Aminosäuren Cys<sup>8</sup> und Cys<sup>9</sup>, die keine ausreichende Intensität der NOE-Signale aufweisen.



**Abbildung 3.41** NH/ $\alpha$ -Ausschnitt des NOESY-Spektrums (600 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) des Peptids **129**. Dargestellt sind die NOE-Kontakte der NH- und  $\alpha$ -Protonen, die anhand der entsprechenden dipolaren Kopplungen zwischen aufeinanderfolgenden Aminosäuren zur Sequenzierung des Peptids genutzt werden können. In rot gezeigt sind *intra-residue* NOE-Kontakte, die ebenfalls im TOCSY-Spektrum detektiert werden, eine geringere Intensität aufweisen und keine zusätzliche strukturelle Information bieten. Die Sequenzierung wird im Fall des Pro<sup>7</sup> und Pro<sup>16</sup> aufgrund des fehlenden amidischen Protons sowie im Bereich der Cys<sup>8/9</sup> basierend auf der zu geringen Signalintensität unterbrochen. Das Signal des Thr<sup>15</sup> wurde aufgrund starker Signalüberlappung im aromatischen Bereich nicht mit abgebildet.

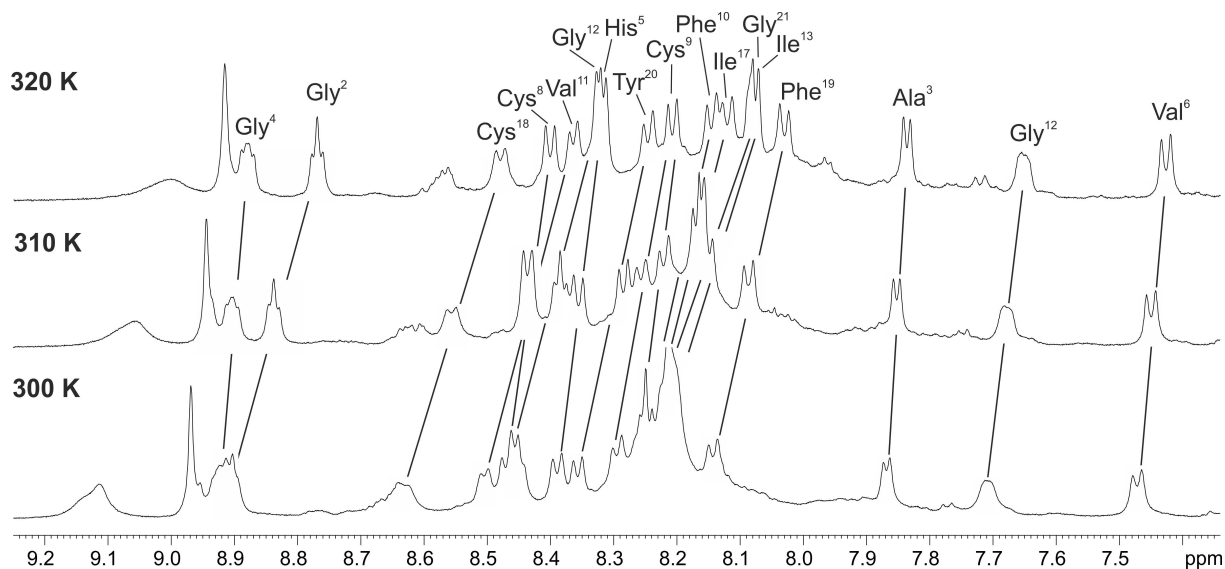
Neben der Sequenzierung des Peptids können anhand des HSQC-Spektrums die vollständige Zuordnung der überlagerten Signale sowie die  $^{13}\text{C}$ -Korrelation der Kohlenstoff-gebundenen Wasserstoffatome erfolgen. In Abbildung 3.42 ist die Zuordnung der Signale zwischen 5.0 und 2.5 ppm exemplarisch aufgeführt. Zur besseren Übersicht wurde das Signal des  $\text{DMSO}_{\text{d}_6}$  bei 40.0 ppm unterdrückt. Bei Betrachtung der  $\alpha$ -Protonen-Signale fällt die starke Aufspaltung der diastereotopen Methylengruppen der Glycine auf, das bereits für eine definierte Struktur des Peptids **129** spricht. Gut zu erkennen sind ebenfalls die  $\beta$ -Protonen der Cysteine, die mit 40 – 45 ppm eine  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung aufweisen, welche typisch für die Aminosäure Cystin ist.<sup>[333–336]</sup>



**Abbildung 3.42** Ausschnitt des HSQC-Spektrums (600 MHz, 300 K,  $\text{DMSO}_{\text{d}_6}$ ) von Peptid **129**. Dargestellt ist der Bereich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen zwischen 2.6 und 5.0 ppm. Die vollständige Zuordnung der Signale erfolgte mittels TOCSY/NOESY-Experimenten. Besonders die starke diastereotopie Aufspaltung der  $\alpha$ -Gly Protonenpaare deutet auf eine definierte Struktur des Peptids hin.

### 3.11.2 Charakterisierung von intramolekularen Wasserstoffbrücken

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 und 3.1.5 beschrieben wurde, kann die Stärke der Wasserstoffbrücken von amidischen Protonen mit Hilfe von experimentell bestimmten Temperaturgradienten eingestuft werden. Zur Bestimmung der Gradienten wurde das Peptid **129** bei 300 K, 310 K und 320 K  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch vermessen. In Abbildung 3.43 ist der NH-Bereich der jeweiligen Spektren dargestellt.



**Abbildung 3.43** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (600 MHz, 300 – 320 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) bei unterschiedlichen Messtemperaturen. Gezeigt ist der NH-Bereich des Peptids **129**. Zu erkennen ist die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der amidischen Protonen mit sehr kleinen Gradienten von 1.6 ppb/K in Fall des  $\text{Ala}^3$  und sehr großen Gradienten von 7.6 ppb/K beim  $\text{Cys}^{18}$ . Die meisten amidischen Protonen weisen gemittelte Temperaturabhängigkeiten auf, wodurch keine zusätzlichen Informationen über die räumliche Struktur erhalten werden kann. Es fällt auf, dass die NH-Signale des N-terminalen Rings eine geringere Temperaturabhängigkeit aufweisen, als die des C-terminalen Macrocyclus.

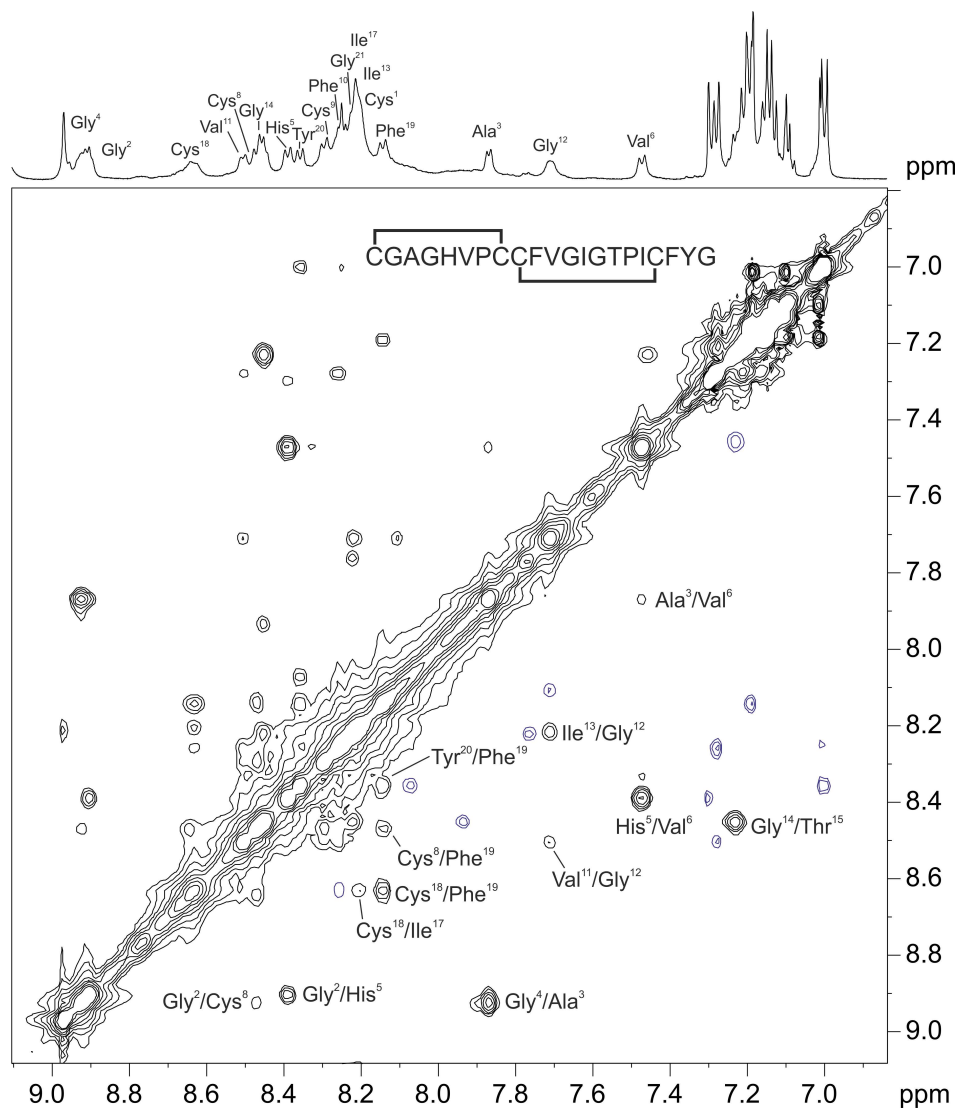
Ersichtlich ist, dass eine Vielzahl der amidischen Protonen gemittelte Temperaturgradienten aufweisen, wodurch keine exakte Aussage, ob eine Wasserstoffbrücke vorliegt, gemacht werden kann. Es ist zu erkennen, dass im Bereich des N-terminalen Macrocyclus die amidischen Protonen eine geringere Temperaturabhängigkeit aufweisen, die auf eine definierte Struktur schließen lassen. Der C-terminale Ring zeigt eine höhere Temperaturabhängigkeit bezüglich der Temperatur und ist unstrukturierter. Um einen Einblick in die räumliche Anordnung des Peptids **129** zu bekommen, wurde im nächsten Schritt ein NOESY-Experiment zur genauen Analyse der Macrocyklen durchgeführt.



### 3.11.3 Aufklärung der Struktur der Tetrasulfide mittels NOE-Kontakten

Für eine detailliertere Analyse der Struktur in Lösung wurden die intramolekularen NOE-Kontakte aus dem NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 150 ms ermittelt. Neben den sequentiellen NOE-Kontakten, die keine strukturellen Informationen liefern, konnten einige *middle-range* und *long-range* NOE-Kontakte detektiert und identifiziert werden.

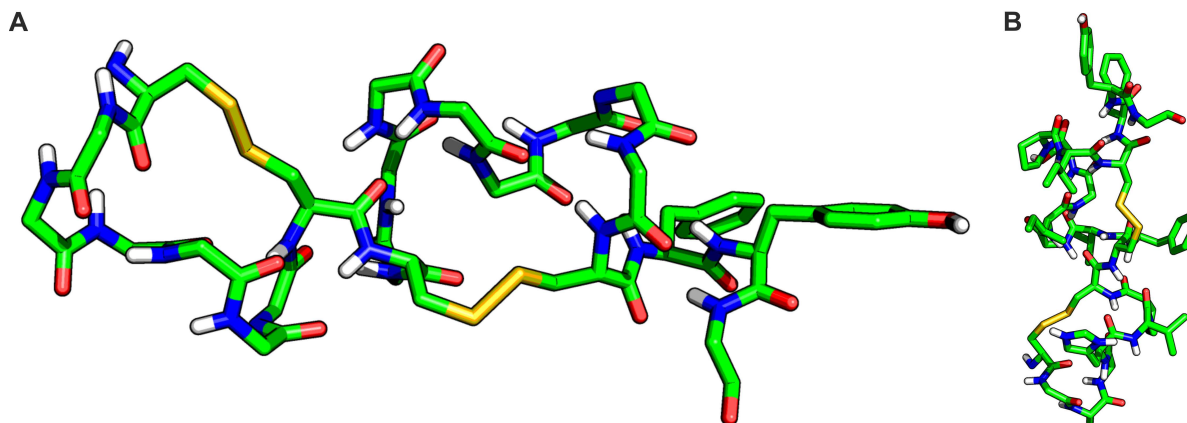
Eine solche Zuordnung ist in Abbildung 3.44 exemplarisch für den NH/NH-Bereich des Peptids **129** dargestellt. Weiterhin sind die intramolekularen NOE-Kontakte der amidischen Protonen aufgeführt.



**Abbildung 3.44** Ausschnitt des NOESY-Spektrums (600 MHz, 300 K, DMSO<sub>d6</sub>) des Peptids **129**. Gezeigt ist der NH/NH-Bereich mit den entsprechenden Kreuzsignalen oberhalb und unterhalb der Diagonalen. NH/NH-NOE-Kontakte, die eindeutig zugeordnet werden konnten, sind beschriftet. Blau dargestellt sind Signale, die nicht zugeordnet werden konnten oder nicht auf das Peptid **129** zurückzuführen sind. Am intensivsten sind die Kontakte der amidischen Protonen, zwischen Gly<sup>4</sup>/Ala<sup>3</sup>, His<sup>5</sup>/Val<sup>6</sup> sowie Gly<sup>14</sup> und Thr<sup>15</sup>. Anhand dieser und weiterer NOE-Kontakte wurde eine dreidimensionale Struktur mittels HyperChem<sup>®</sup> berechnet, die in Abbildung 3.45 dargestellt ist.



Basierend auf der Sequenzierung und vollständigen Zuordnung der NMR-Spektren des Tetrasulfid-Peptids **129** wurde mittels HyperChem® eine energieminierte dreidimensionale Durchschnittskonformation erstellt (siehe Abb. 3.45).



**Abbildung 3.45** Energieminimierte Durchschnittskonformation des Tetrasulfids **129** basierend auf NOE-Kontakten. Berechnet wurde die Struktur mittels HyperChem®. **A)** Darstellung des Peptidrückgrats ohne die Seitenkettenreste. Lediglich die Seitenketten des Phe<sup>19</sup> und Tyr<sup>20</sup> sowie die amidischen Protonen sind zur besseren Übersicht mit abgebildet. Durch die reduzierte Darstellung kann der N- und C-terminale Macrocyclus erkannt werden. Es wird deutlich, dass die Aminosäuren Phe<sup>19</sup> und Tyr<sup>20</sup>, die im nativen Peptid durch den N-terminalen Ring durchgefädelt sind, in der postulierten Struktur am weitesten von dem Macrocyclus entfernt sind. **B)** Darstellung des Peptids **129** mit den Seitenkettenresten der Aminosäuren. Der N-terminale Macrocyclus befindet sich unten, die C-terminalen Aminosäuren Phe<sup>19</sup> und Tyr<sup>20</sup> oben.

Der N-terminale und der C-terminale Macrocyclus sind vollständig voneinander separiert und zeigen in Abb. 3.45 keine Wechselwirkung miteinander. Es fällt auf, dass das C-terminale Ende des Peptids, welches im nativen Microcin J25 durch den N-terminalen Ring durchgefädelt ist, in der postulierten Struktur eine gestreckte Konformation einnimmt und weit vom N-terminalen Ring entfernt ist. Der Hauptgrund dafür liegt in der zeitlichen Abfolge der Bildung der Disulfidbrücken. Da der N-terminale Ring zuerst gebildet wird, ist keine Einfädelung des C-terminalen Endes aufgrund der sterisch anspruchsvollen Seitenkettenreste möglich. Die Bildung des zweiten Disulfids kann daher nicht zur richtigen Topologie führen. Im direkten Vergleich zu Peptid **129** ist besonders die zeitlich inverse Bildung der Disulfidbrücken interessant und wurde im Peptid **130** realisiert. Wie bereits in Kapitel 3.10.2 angesprochen wurde, werden nicht identische <sup>1</sup>H-NMR-Spektren für die Peptide erhalten, obwohl jeweils die exakte Masse mittels ESI-HRMS bestimmt werden konnte. Im folgenden Kapitel wird auf die Struktur des Peptids **130** näher eingegangen.

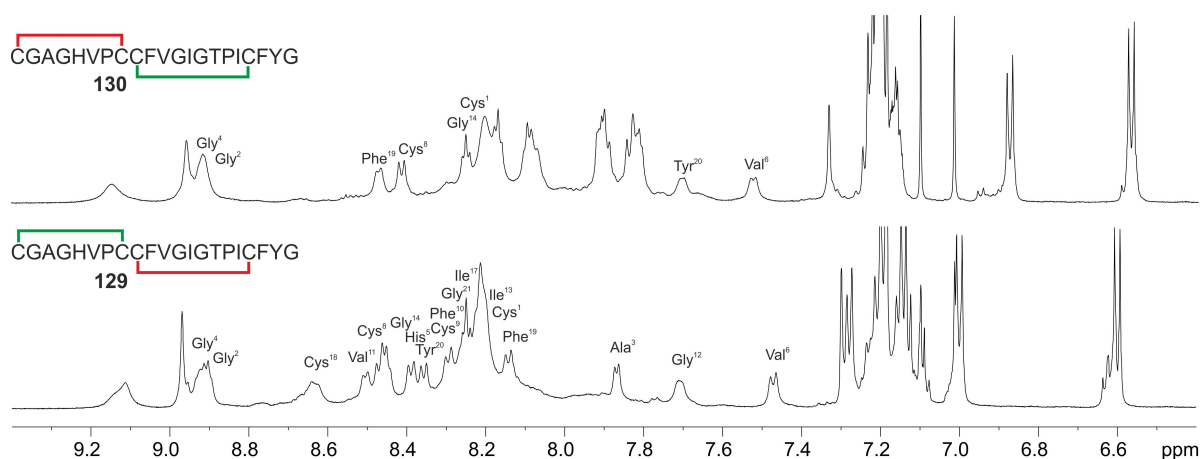
### 3.11.4 Inverse Cyclisierung eines Microcin J25 Tetrasulfids

Durch die Cyclisierung des C-terminalen Rings vor dem N-terminalen Ring wird das Peptid **130** erhalten (siehe Abb. 3.46). Dieses weist dieselbe Konstitution wie Peptid **129** auf, zeigt aber unterschiedliche Eigenschaften im Rahmen der NMR-spektroskopischen sowie chromatographischen Analytik. Die zweite Disulfidbrücke, die den N-terminalen Macrocyclus bildet, kann sich vor der Cyclisierung um das C-terminale Peptidende wickeln. Dies ist bei der Synthese des Peptids **129** nicht möglich gewesen. Voraussetzung dafür ist die korrekte Ausbildung einer  $\beta$ -*hairpin* ähnlichen Struktur, welche das Peptid ausreichend vorfaltet.



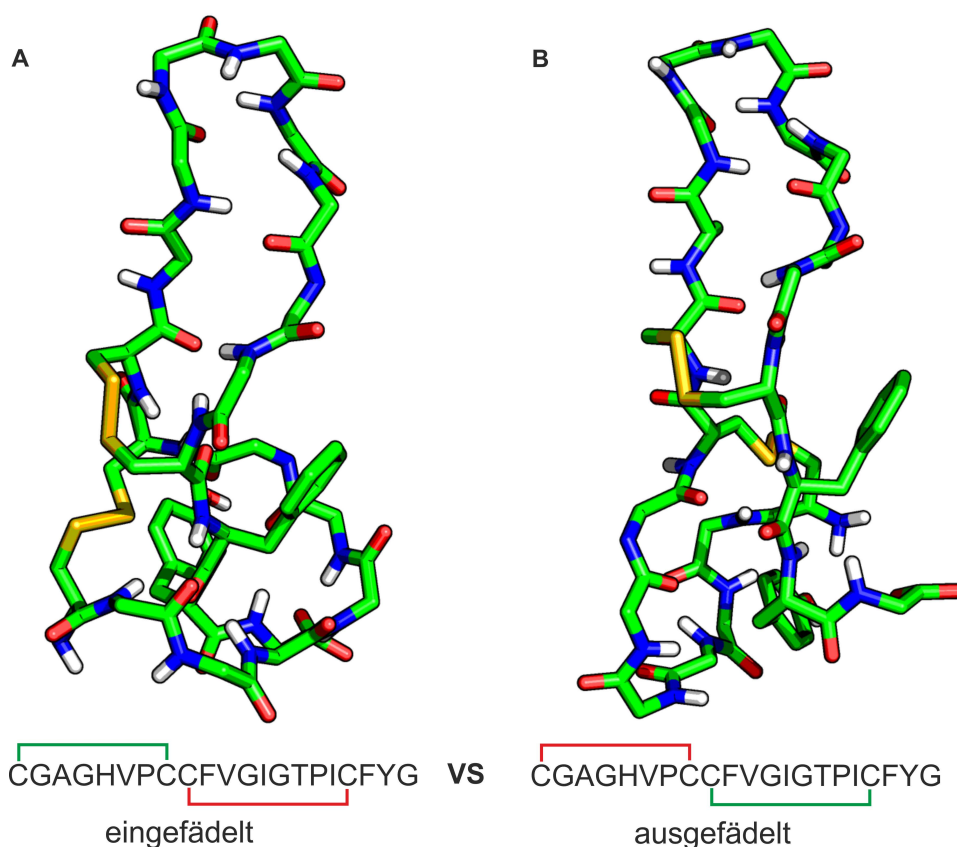
**Abbildung 3.46** Inverse Cyclisierung des Peptids **129** zu Peptid **130**. In grün ist die Disulfidbrücke markiert, die zuerst gebildet wurde. In rot dargestellt ist die zweite Disulfidbrücke, die durch Iod-katalysierte Abspaltung der AcM-Schutzgruppen und gleichzeitige Oxidation zum Disulfid geformt wurde.

Die Synthese und Charakterisierung der Peptide erfolgte analog zu Kapitel 3.10. Eine NMR-spektroskopische Analyse und vollständige Zuordnung der Resonanzsignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist aufgrund der geringen Dispersion und Überlagerung der Signale nicht möglich gewesen. In Abbildung 3.47 sind die NH-Bereiche der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Peptide **129** und **130** zum Vergleich dargestellt. Ersichtlich wird, dass sich die Peptide in ihrer Struktur, die vom entsprechenden Disulfidmuster abhängig ist, stark unterscheiden.



**Abbildung 3.47** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Peptide **129** (unten) und **130** (oben). Gezeigt ist der NH-Bereich von 9.4 ppm bis zum aromatischen Bereich bei 6.4 ppm. Eine vollständige Zuordnung der Resonanzsignale des Peptids **130** konnte aufgrund der geringen Dispersion und der Signalüberlappung nicht durchgeführt werden. Neben dem charakteristischen NH-Bereich zeigen ebenfalls die Alkylsignale der aliphatischen Aminosäuren Val<sup>6</sup>, Val<sup>11</sup>, Ile<sup>13</sup> und Thr<sup>15</sup> eine unterschiedliche chemische Verschiebung.

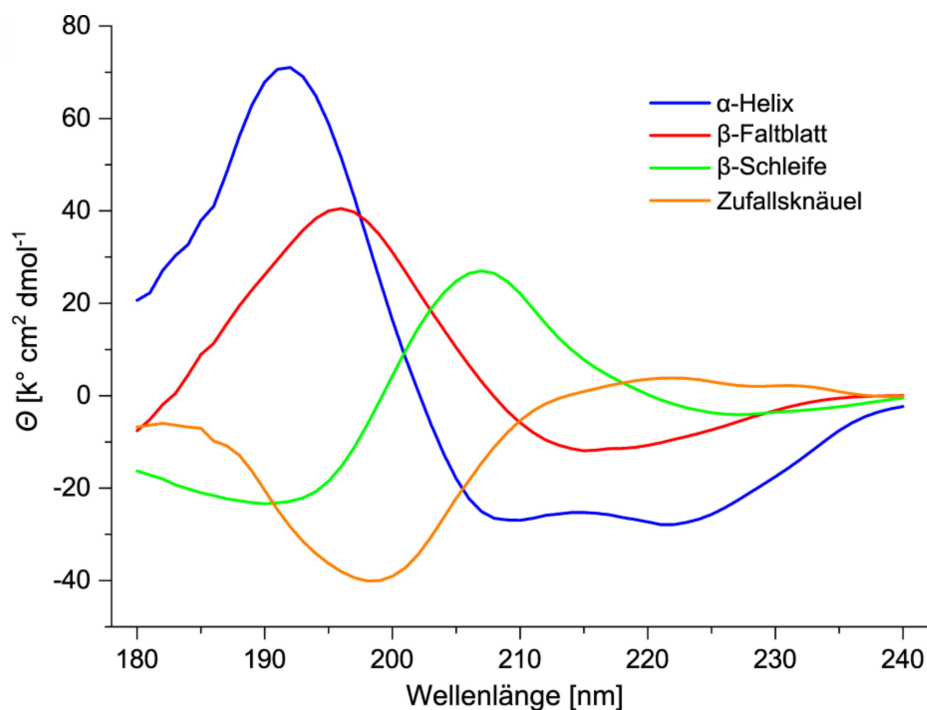
Eine Strukturaufklärung, wie sie im Fall des Peptids **129** in Kapitel 3.11.1-3 durchgeführt wurde, konnte aufgrund der geringen Dispersion der amidischen Protonen sowie der Überlappung der Signale nicht realisiert werden. Basierend auf der dreidimensionalen Struktur des Microcins J25 von ROSENGREN et al. (PDB Code 1Q71)<sup>[129]</sup> wurde die korrekt eingefädelte und erwünschte Struktur dargestellt (siehe Abb. 3.48-A). Als ein weiteres mögliches topologisches Isomer ist in Abbildung 3.48-B das ausgefädelte Peptid gezeigt. Bei diesem ist der N-terminale Macrocyclus lediglich in der Nähe der C-terminalen Aminosäuren Phe<sup>19</sup> und Tyr<sup>20</sup> lokalisiert. Die Struktur ist nicht durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert und demnach flexibel.



**Abbildung 3.48** Energieminimierte Durchschnittskonformationen der hypothetischen, eingefädelten bzw. ausgefädelten Microcin J25 Cystein-Mutante **129/130** basierend auf der Struktur des PDB-Codes 1Q71.<sup>[129]</sup> **A)** Darstellung der korrekt eingefädelten Tetrasulfid-Mutante, die dem nativen Microcin J25 entspricht. **B)** Gezeigt ist eine idealisierte, ausgefädelte Struktur der Microcin J25 Cystein-Mutante, die kompakt dargestellt ist, aber aufgrund der fehlenden intramolekularen Wechselwirkung flexibel ist.

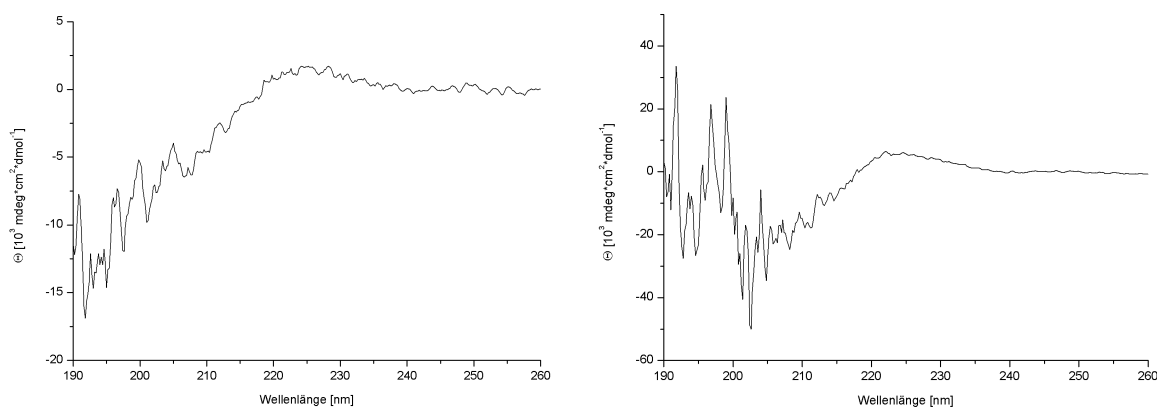
### 3.12 CD-Spektroskopie von Microcin J25 und dessen Derivaten

Neben den 2D-NMR-spektroskopischen Methoden können Strukturen von Proteinen und Peptiden mittels CD-Spektroskopie untersucht und bestimmt werden. Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse ist die CD-Spektroskopie eine kostengünstige und schnelle Methode. Basierend auf dem Circular dichroismus, welcher auf der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit einer gelösten, optisch aktiven Verbindung beruht, lassen sich durch Vergleich von bekannten Strukturproteinen Sekundärstrukturen wie Helices,  $\beta$ -Faltblätter oder *random coil*/Strukturen von Proteinen/Peptiden ermitteln.<sup>[353-355]</sup> Dieser Effekt wird beobachtet, wenn beide zirkular polarisierten Komponenten des Lichts unterschiedlich stark absorbiert werden. Durch die Absorption wird die Amplitude des Feldvektors im Betrag kleiner. Für die CD-Spektroskopie werden die in Peptiden vorkommenden Chromophore wie Amid-Bindungen (180-230 nm), Disulfidbrücken ( $\sim 250$  nm) und aromatische Seitenketten (250-280 nm) genutzt. Insbesondere ist der Fern-UV-Bereich für die Strukturaufklärung von Proteinen/Peptiden interessant. Die bestimmten Strukturen sind oftmals nur ein Indiz und stellen lediglich grob und global die eingenommene Konformation dar. In Abbildung 3.49 sind entsprechende idealisierte CD-Spektren der drei Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -Schleife sowie einer *random coil* Struktur gezeigt, die als Referenz für die durchgeführten Messungen dienen.



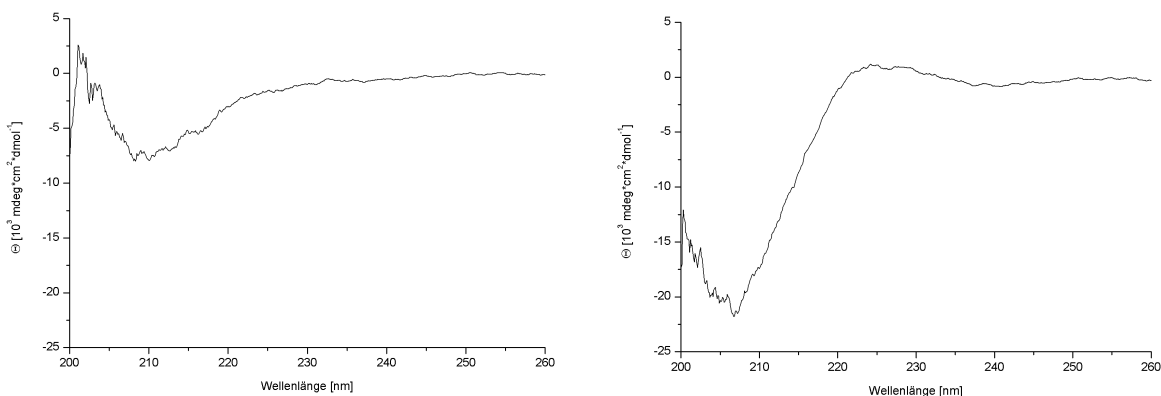
**Abbildung 3.49** Verschiedene CD-Spektren der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix (blau),  $\beta$ -Faltblatt (rot) und  $\beta$ -Schleife (grün) im Vergleich zu einem Zufallsknäuel (*random coil*, orange). Gezeigt ist der für CD-Spektren typische Bereich zwischen 180 nm und 240 nm. Die Abbildung basiert auf Daten von GIMPL et al. und BRAHMS et al.<sup>[356,357]</sup>

Zur Bestimmung der CD-Absorption erfolgten Messungen an einem *JASCO J-810* CD-Spektrometer unter Verwendung einer *HELMA* QS Quarzglasküvette ( $d = 0.2$  cm). Die Bandweite betrug 1 nm, die Ansprechzeit 2 s und die Vorschubgeschwindigkeit 100 nm/min. Die Spektren wurden als Durchschnitt von fünf Messungen erhalten und von 190 bis 260 nm gemessen. Es wurden zunächst konzentrationsabhängige CD-Spektren des Peptids **129** aufgenommen, um die optimale Konzentration zu ermitteln, bei welcher die verlässlichsten Daten erhalten werden können. Es wurden 50, 100 und 200  $\mu$ molare Lösungen des entsprechenden Peptids in Phosphat-Puffer (pH 3, 50 mM) angesetzt und vermessen. Die erhaltenen Spektren der 50 und 200  $\mu$ molaren Lösungen sind in Abbildung 3.50 dargestellt. Die Erhöhung der Konzentration der Probelösung führte zu keiner qualitativen Verbesserung der Spektren. Zusätzlich ist bei zu geringen Wellenlängen, ein zu hohes Rauschen zu beobachten. Daraus folgt, dass keine sinnvollen Werte mehr gemessen werden können. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben und ist vor allem auf die Eigenabsorption des Lösungsmittels zurückzuführen.<sup>[355,358,359]</sup>



**Abbildung 3.50** CD-Spektren des Peptids **129** bei unterschiedlichen Konzentrationen (Phosphat-Puffer pH 3, 50 und 200  $\mu$ M, 0.2 cm Küvette). Links dargestellt ist das Peptid **129** bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M und rechts bei 200  $\mu$ M. Die geringere Konzentration zeigt weniger Rauschen im kurzwelligen Bereich. Die Messung bei einer höheren Konzentration weist hingegen ein starkes Rauschen auf. Unter einer Wellenlänge von 200 nm ist das Signal-Rausch-Verhältnis zu schlecht und diese Werte werden in weiteren Spektren nicht näher betrachtet. Im Vergleich mit bekannten Peptidstrukturen kann in diesem Fall von einer Struktur ausgegangen werden, die nicht in eines der klassischen Strukturmodule eingestuft werden kann.

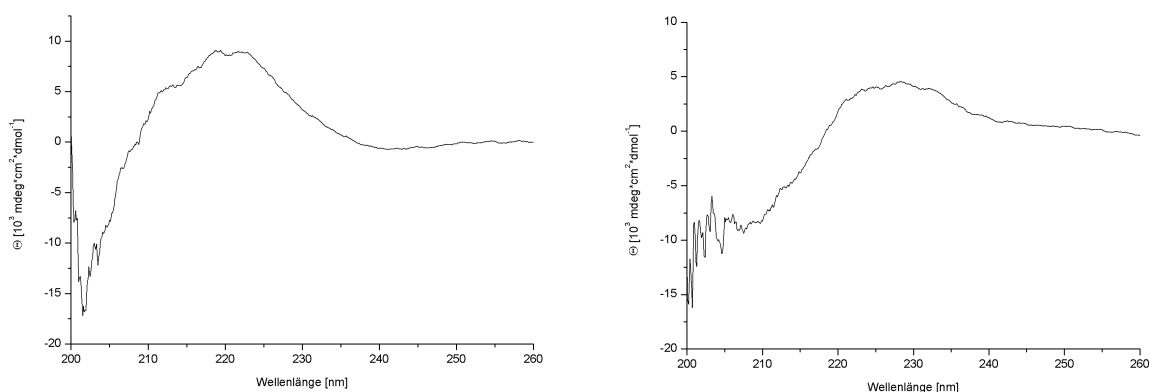
Der Verlauf der Spektren zeigt, dass das Peptid **129** keine bekannte Konformation einnimmt bzw. nicht in eines der drei klassischen Strukturelemente eingeteilt werden kann (siehe Abb. 3.50). Dies wird erwartet, da natives Microcin J25 aufgrund der besonderen Topologie ebenfalls nicht in eines der drei Strukturelemente eingeteilt werden kann. Zur weiteren CD-Spektroskopie basierten Strukturanalyse der Di- und Tetrasulfide sowie dem strukturellen Einfluss der zweiten Disulfidbrücke wurden vom Disulfid-Peptid **128a** sowie dem Tetrasulfid **128** CD-Spektren gemessen und verglichen. Verwendet wurden 100  $\mu$ molare Lösungen der Peptide in Phosphat-Puffer bei pH 3 (siehe Abbildung 3.51).



**Abbildung 3.51** CD-Spektren des Disulfids **128a** (links) und des Tetrasulfids **128** (rechts) bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Phosphat-Puffer pH 3, 0.2 cm Küvette). Im Vergleich der beiden Spektren ist ersichtlich, dass beim Disulfid **128a** kein ausgeprägtes Maximum bei 220 nm erreicht wird, im Spektrum des Tetrasulfids hingegen ein leichtes Maximum bei dieser Wellenlänge erkennbar ist. Der größte Unterschied liegt im kurzwelligen Bereich zwischen 200 und 220 nm. Hier weist das Tetrasulfid ein ausgeprägtes Minimum auf, das beim Disulfid nur gering ausfällt. Beide Spektren weisen erneut auf eine *random-coil* Struktur hin.

Die Analyse des CD-Spektrums des Disulfids **128a** zeigt im Vergleich mit dem Tetrasulfid **128** keine große Veränderung im Bereich von 220 bis 260 nm. Unter einer Wellenlänge von 220 nm entsteht im Fall des Tetrasulfids ein stärker ausgeprägtes Minimum, das sich um den Faktor drei in der molaren Elliptizität unterscheidet. Keines der Spektren weist jedoch auf eine Vorzugskonformation hin. Der Verlauf der molaren Elliptizität im Zusammenhang mit der Wellenlänge ähnelt den Daten einer *random-coil* Struktur.

Als Referenz wurde natives und korrekt eingefädertes Microcin J25 **118** unter identischen Bedingungen vermessen. Dessen, in Abbildung 3.52 (links) dargestellte, CD-Kurve weist keinen idealisierten Verlauf auf, der einer allgemeinen Sekundärstruktur entspricht, und ähnelt in ihrer Form dem synthetischen Tetrasulfid-Peptid **131** (rechts).

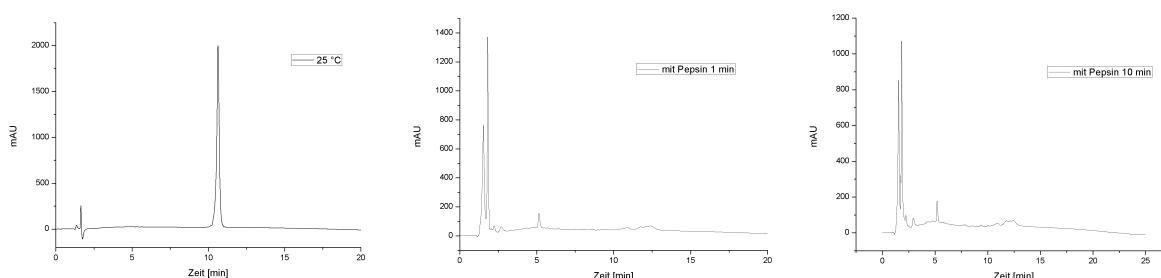


**Abbildung 3.52** CD-Spektren des nativen Microcins J25 **118** (links) und des Tetrasulfids **131** (rechts). Abgesehen von den unterschiedlich ausgeprägten Maxima und Minima werden vergleichbare Spektren erhalten. Dies lässt auf eine nicht gänzlich andere Struktur der synthetischen Tetrasulfide schließen. Besonders im Vergleich mit dem Disulfid **128a** (Abb. 3.51, links) führt die zweite Disulfidbrücke zu einer Lasso-ähnlichen Struktur. Die Frage, ob die synthetischen Peptide die korrekte Topologie einnehmen, lässt sich mit dieser Methode nicht eindeutig klären.

### 3.13 Chemische und thermische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide

#### 3.13.1 Proteolytische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide

Lasso peptide besitzen, basierend auf ihrem schwer zugänglichen C-Terminus, eine erhöhte Stabilität gegenüber Carboxypeptidasen wie den Carboxypeptidasen Y und P. Im Vergleich dazu können verzweigt-cyclische Peptide aufgrund der besseren Zugänglichkeit des C-terminalen Endes bis auf den Macrocyclus hydrolysiert werden. Zur schnellen Differenzierung zwischen eingefädelt und ausgefädelt kann als erster Hinweis ein Stabilitätstest des vermeintlichen Lasso peptides mit Exopeptidasen durchgeführt werden.<sup>[132,135,143,144,360]</sup> Microcin J25 (**118**) weist zusätzlich eine hohe Stabilität gegenüber Endoproteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin, welche das Lasso peptide nicht innerhalb von 30 min hydrolysieren können, auf.<sup>[47,127,193,361]</sup> Zur Untersuchung des Verdaus der Microcin J25 Tetrasulfide durch proteolytische Enzyme wurden Experimente mit Pepsin durchgeführt. Pepsin entfaltet seine höchste Aktivität bei einem pH-Wert um 2 und wird ab einem pH-Wert über 6 irreversibel inaktiviert.<sup>[362,363]</sup> Dieser pH-Bereich ist gut geeignet, um Disulfid-verbrückte Peptide zu analysieren, da mögliches Disulfid-Shuffling bei einem niedrigen pH-Wert weitgehend unterdrückt wird. Basierend auf dem Protokoll zum proteolytischen Verdau von Soudy et al. wurde Pepsin in HCl (0.1 M, 4% w/w) gelöst und anschließend das Peptid **129** (150  $\mu$ M) zugefügt. Die Lösung wurde bei 40 °C inkubiert und die Reaktion nach bestimmten Zeitintervallen (1 und 10 min) mit NaOH (0.1 M) beendet. Es wurden 100  $\mu$ L Aliquote genommen und in NaOH (0.1 M, 10  $\mu$ L) gegeben.<sup>[47,364]</sup> Die Proben wurden mittels HPLC charakterisiert (siehe Abb. 3.53). Es konnte gezeigt werden, dass die Tetrasulfid-Peptide keine Lasso-Konformation aufweisen und bereits nach 1 min Reaktionszeit durch Pepsin hydrolysiert werden. Das Ergebnis tritt bei sämtlichen Tetrasulfiden auf. Die temperaturabhängige Stabilität dieser Peptide wurde anschließend mittels HPLC und NMR-spektroskopisch untersucht.

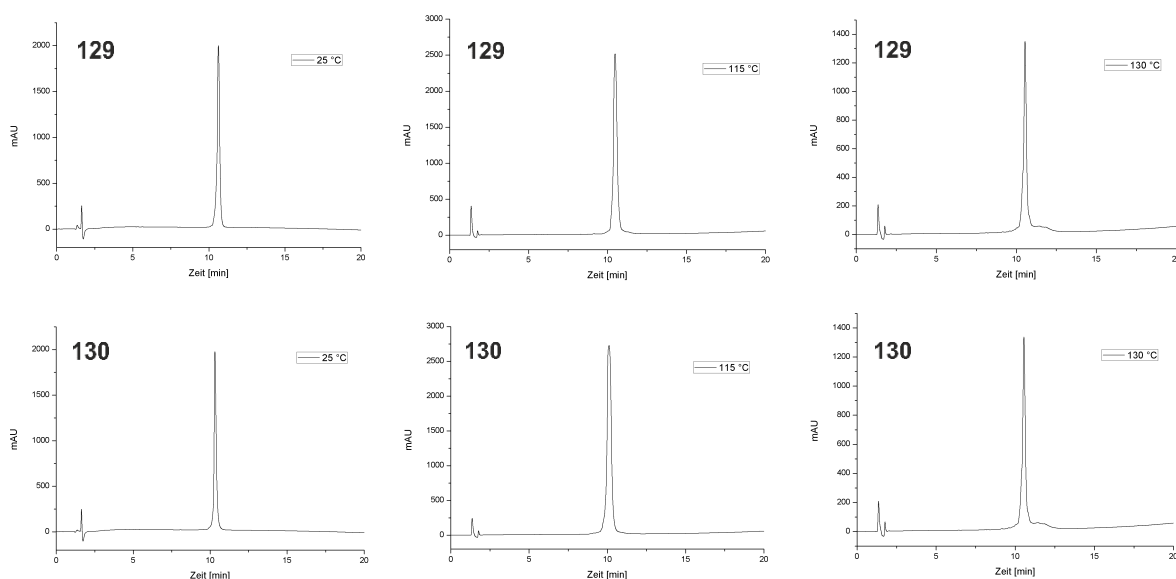


**Abbildung 3.53** HPLC-Chromatogramme des proteolytischen Verdaus des Peptids **129**. Gezeigt ist links die Verbindung als Reinstoff. In der Mitte dargestellt ist die Proteolyse nach 1 min Reaktionszeit und rechts nach 10 min Reaktionszeit. Es ist eindeutig erkennbar, dass mittels Pepsin bei einem pH-Wert von 2 das Microcin Derivat keine Stabilität aufweist und hydrolysiert wird. Dies liegt daran, dass das Tetrasulfid nicht korrekt eingefädelt ist und keine kompakte und unzugängliche Struktur wie das Microcin J25 einnimmt.

### 3.13.2 Thermische Stabilität der Microcin J25 Tetrasulfide

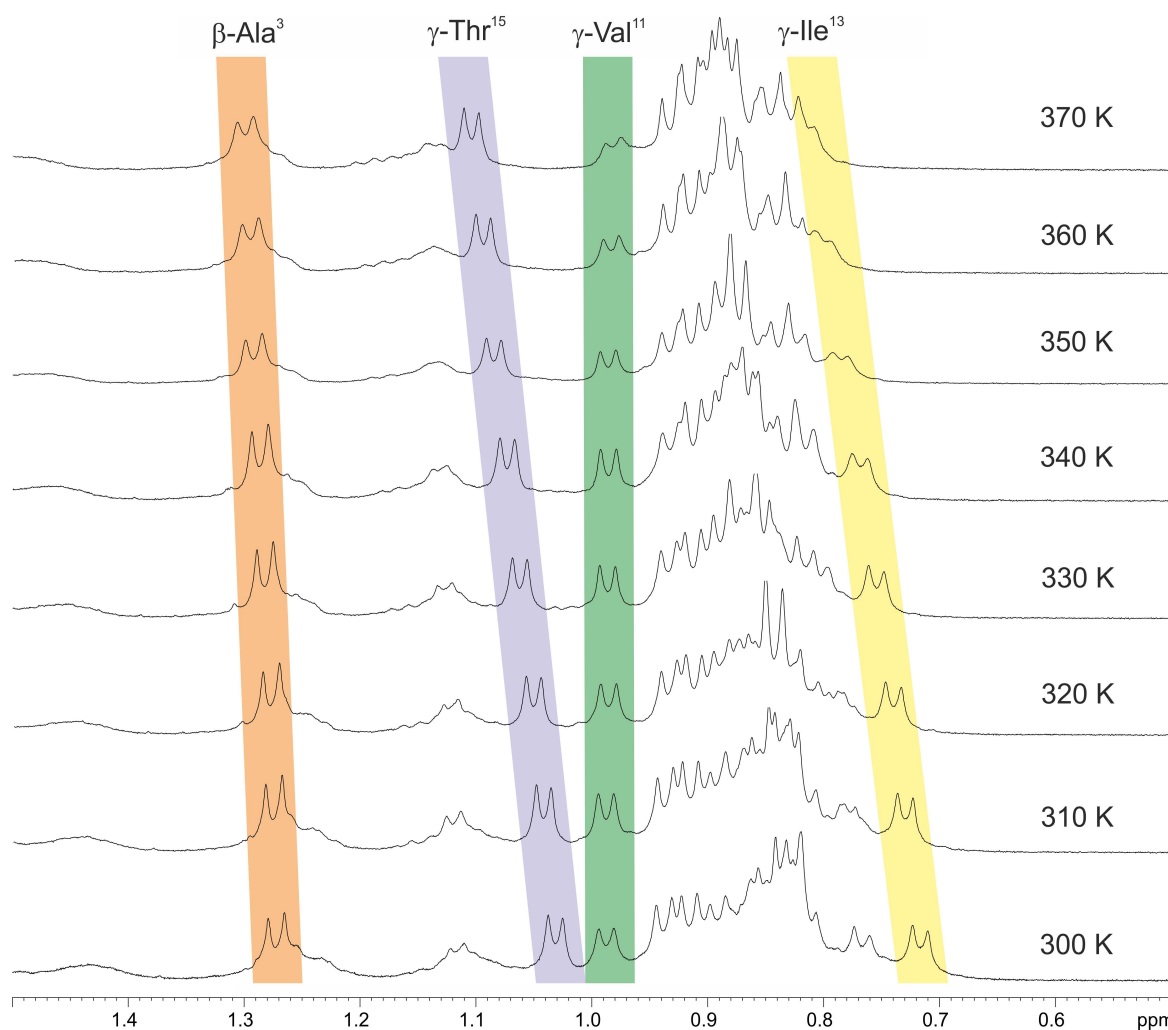
Einige der im Kapitel 1.3.1 aufgeführten Lasso peptide wie Astexin, Capistruin und vor allem Microcin J25 weisen zusätzlich eine besondere Stabilität gegenüber hohen Temperaturen auf.<sup>[28,123,134]</sup> Microcin J25 behält seine Topologie bis zu einer Temperatur von 115 °C und bei Anwesenheit von denaturierenden Reagenzien wie Guanidinium-Hydrochlorid (6 M) oder Harnstoff (8 M) bis zu 65 °C.<sup>[28]</sup> Xanthomone können in wässriger Umgebung bei einer Temperatur von 95 °C bis zu 8 h erhitzt werden, ohne dass die Struktur ausfällt.<sup>[134]</sup> Neben diesen sehr stabilen Lasso peptiden gibt es eingefädelte Peptide, die keine stabile Struktur aufweisen und schnell durch thermische Belastung denaturieren. Caulosegnin I entfädelt bereits komplett nach einer Inkubationszeit von 4 h bei einer Temperatur von 95 °C.<sup>[132]</sup>

Für eine erste Einschätzung der thermischen Stabilität der Tetrasulfid-Derivate wurden die Peptide **129** und **130** in Wasser bei einem pH-Wert von 6.5 gelöst und auf 115 °C sowie 130 °C für jeweils 1 h in einem Druckrohr erwärmt. Beide Proben wurden möglichst schnell abgekühlt und die verbliebene Reinheit mittels HPLC überprüft. Wie in Abbildung 3.54 zu sehen, entstehen keine kleineren Fragmente. Beide Peptide zeigen demnach eine hohe thermische Stabilität, die im Folgenden noch NMR-spektroskopisch analysiert wird.



**Abbildung 3.54** HPLC-Chromatogramme der Peptide **129** und **130**. Oben gezeigt sind die Chromatogramme des Peptids **129** bei RT als Reinstoff, nach Erhitzen auf 115 °C für 1 h und nach Erhitzen auf 130 °C für 1 h. Es ist zu erkennen, dass das Peptid stabil bleibt. Lediglich entsteht bei 130 °C eine geringe Menge an Zersetzungsprodukten. Unten ist derselbe Verlauf mit dem Peptid **130** gezeigt. Die Chromatogramme wurden analog interpretiert. Eine weitere Erwärmung konnte aus praktischen Gründen nicht weiter verfolgt werden.





**Abbildung 3.55** Ausschnitt des Alkylbereichs der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Peptid **131** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 – 370 K). Durch die Messung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Peptids **131** bei erhöhten Temperaturen wurden die Temperaturabhängigkeiten der Alkylgruppen des Ala (rot), Thr (blau), Val (grün) und Ile (gelb) bestimmt und die Stabilität der Struktur bestätigt. Der übrige Bereich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren besonders die NH-Region tauscht aufgrund der erhöhten Temperatur schnell aus und kann in diesem Experiment nicht genauer analysiert werden.

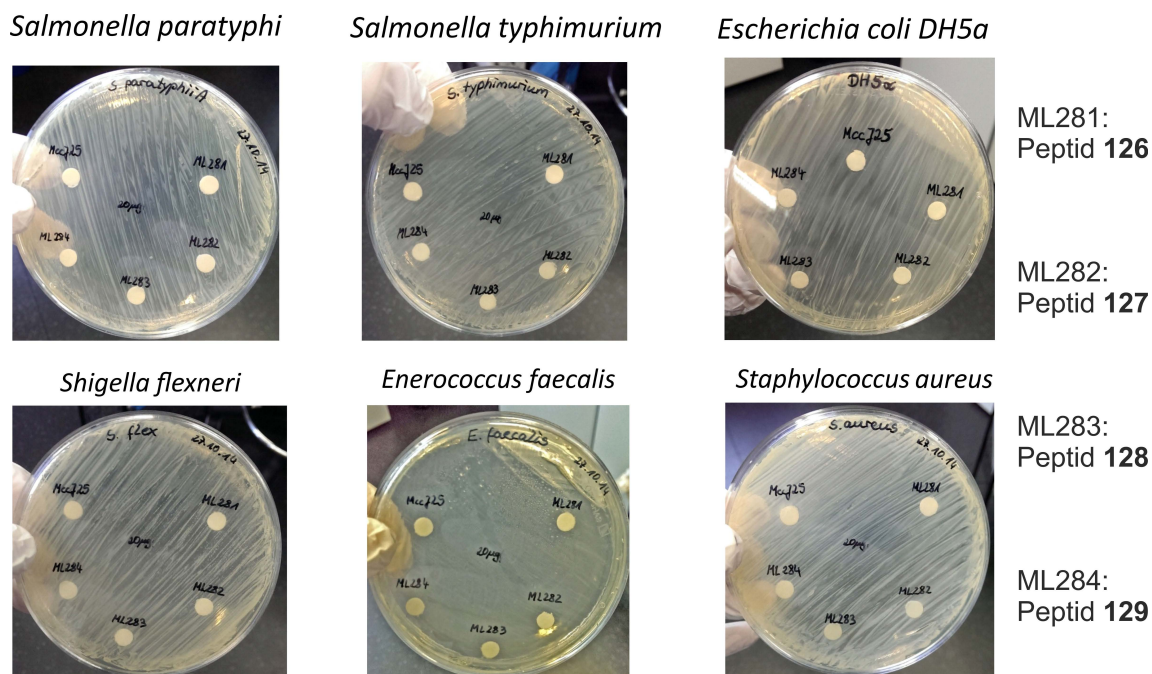
Die Stabilität, der in dieser Arbeit synthetisierten Microcin J25 Tetrasulfide, wurde mittels NMR-Spektroskopie in einem Temperaturbereich von 300 K bis 370 K (27 – 97 °C) in  $\text{DMSO-d}_6$  durch Messen von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in 10 K Schritten analysiert. Die Ergebnisse sind beispielhaft an dem Peptid **131** gezeigt und gelten analog für die weiteren Tetrasulfide (siehe Abb. 3.55). Es wurden die Temperaturabhängigkeiten der Alkylgruppen des Ala (0.41 ppb/K), Thr (1.05 ppb/K), Val (0.04 ppb/K) und des Ile (1.44 ppb/K) bestimmt. Anhand dieser Daten ist zu erkennen, dass das Peptid **131** noch bei einer Temperatur von fast 100 °C eine stabile Hauptkonformation ausbildet und sich die Disulfidbrücken nicht zersetzen bzw. ein Austausch stattfindet. Dieses Verhalten wurde bei weiteren Tetrasulfiden beobachtet und wird für sämtliche Peptide dieser Klasse angenommen.

### 3.14 Bestimmung der biologischen Aktivität von synthetischen Peptiden

#### 3.14.1 Bestimmung der biologischen Aktivität von synthetischen Microcinen

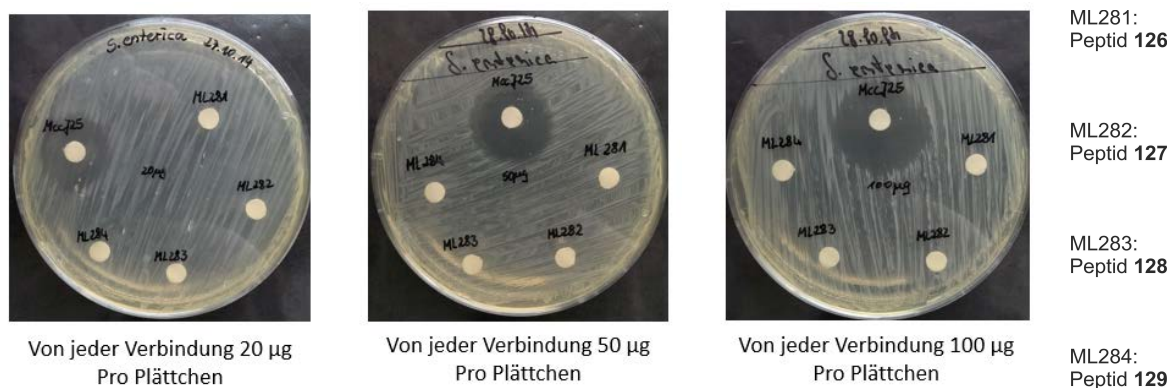
Die antimikrobiellen Eigenschaften, die auf der einzigartigen Topologie der Lasso peptide beruhen, sind gute Indizien für die erfolgreiche Synthese eines Lasso peptides. Microcin J25 gilt als das am besten untersuchte Lasso peptide und wird daher oft als Zielverbindung in der organisch-chemischen Lasso peptide-Synthese verwendet. In den antimikrobiellen Eigenschaften konnten bisher keine synthetischen Derivate in die Nähe der biologischen Aktivität des nativen Microcins J25 gelangen.<sup>[47,48]</sup>

Die in Kapitel 3.9 und 3.10 dargestellten Peptide **126 - 129** wurden in einer Kooperation mit dem Institut für medizinische Mikrobiologie der JUSTUS-LIEBIG UNIVERSITÄT Gießen auf ihre biologische Aktivität gegenüber *gram*-negativen Bakterien untersucht. Als biologische *targets* wurden Bakterienstämme ausgewählt, die in ihrem Wachstum in geeigneten Nährmedien durch natives Microcin J25 gehemmt werden. Im Speziellen waren dies die Stämme: *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterohämorrhagische Escherichia coli* (EHEC) und *Escherichia coli* AS19. Um einen ersten Einblick in die Aktivität der Peptide **126 - 129** zu bekommen, wurden Hemmhoftests mit jeweils 20  $\mu$ g der entsprechenden Verbindung durchgeführt, die bei 37 °C über Nacht auf Agarplatten inkubiert wurden (siehe Abb. 3.56).



**Abbildung 3.56** Darstellung der Hemmhoftests der synthetisierten Tetrasulfide **126 - 129**. Verwendet wurden jeweils 20  $\mu$ g der entsprechenden Verbindung, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. In allen hier gezeigten Fällen ist die Menge an verwendetem Peptid zu gering und die Verbindungen zeigen keine Wachstumshemmung der Bakterien.

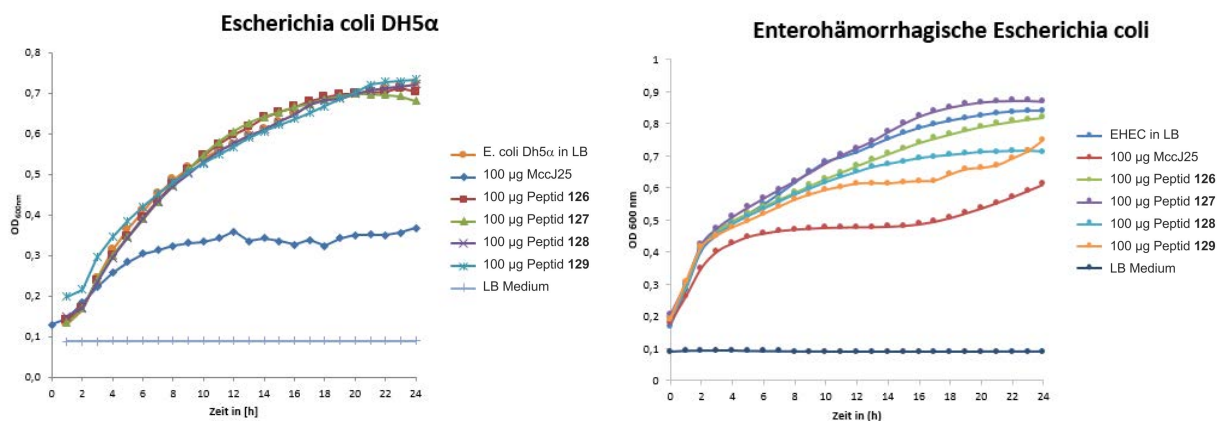
Als Referenz diente in allen Versuchen natives Microcin J25 (**118**), das biosynthetisch im Arbeitskreis MARAHIEL (PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG) hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Wie in Abbildung 3.56 zu sehen ist, zeigen sämtliche synthetische Peptide keine biologische Aktivität. Dies könnte daran liegen, dass die Menge an verwendetem Peptid bei diesen Bakterienstämmen zu niedrig gewählt wurde, da selbst natives Microcin J25 keine Wachstumshemmung zeigt. Aufgrund der zu geringen Menge der Verbindungen wurde bei den Experimenten zur Wachstumshemmung von *Salmonella enterica*, ein im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht verwendeter Bakterienstamm, die Messung einer Konzentrationsreihe von 20, 50 und 100 µg Peptid durchgeführt. Es zeigte sich, dass Microcin J25 (**118**) in allen drei Experimenten eine Aktivität aufweist und sämtliche synthetischen Peptide keine Hemmung des Wachstums hervorrufen (siehe Abb. 3.57).



**Abbildung 3.57** Messung der Wachstumshemmung bei 20, 50 und 100 µg Peptid. Deutlich zu erkennen ist der jeweilige Hemmhof im Bereich des Microcins J25. Die synthetischen Peptide **126** - **129** zeigen auch nach Erhöhung der Substanzmenge keine signifikante biologische Aktivität.

Zur weiteren Bestimmung der biologischen Aktivität bzw. der Hemmung des Wachstums von *gram*-negativen Bakterien wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von 24 h gemessen. Das Wachstum fand in einem LB-Medium (*lysogeny broth*), das von GIUSEPPE BERTANI formuliert wurde und heutzutage aus 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und einer variierenden Menge an Natriumchlorid (1 – 10 g) pro Liter besteht, bei 37 °C auf Agarplatten statt.<sup>[365]</sup> Das Wachstum der entsprechenden Bakterien erfolgte bei pH 7 und die Wachstumskurven wurden durch automatische Messung der optischen Dichte in 96-Well-Platten bei 600 nm mittels eines Infinite® 200 Series Plattenreader (*Tecan*) bestimmt. In Abbildung 3.58 sind beispielhaft die Wachstumskurven von *Escherichia coli* DH5α und Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (ein EHEC-Ausbruchstamm) dargestellt. In diesen Experimenten wurden jeweils 100 µg der Microcin J25 Derivate **126** - **129** und des nativen Microcins J25 (**118**) in einem Gesamtvolumen von 150 µL LB-Medium eingesetzt. Neben Microcin J25 als Referenzverbindung wurde eine Negativ-Kontrolle, nur LB-Medium sowie

EHEC in LB-Medium, vermessen. *Escherichia coli DH5 $\alpha$*  ist ein nicht pathogener, gram-negativer Bakterienstrang, der für die Nutzung in biochemischen Labors entwickelt wurde.<sup>[366,367]</sup> In Abbildung 3.58 ist zu erkennen, dass Microcin J25 (**118**) als einzige Verbindung das Wachstum hemmt und die synthetischen Peptide **126** - **129** keine Hemmung des Wachstums verursachen. Dies ist ein positives Ergebnis, da gegenüber diesem Bakterium keine Aktivität gewünscht ist.



**Abbildung 3.58** Wachstumskurven der *E. coli* Stränge *DH5 $\alpha$*  (links) und *EHEC* (rechts) über einen Zeitraum von 24 h unter Zugabe von 100  $\mu$ g der Peptide **126** - **129** mit einer Negativkontrolle sowie nativem Microcin J25 (**118**) als Referenz. Die Experimente erfolgten in 150  $\mu$ l LB-Medium bei 37 °C und die Wachstumskurven wurden durch automatische Messung der optischen Dichte in 96-Well-Platten bei 600 nm mittels eines Infinite® 200 Series Plattenreader (Tecan) bestimmt.

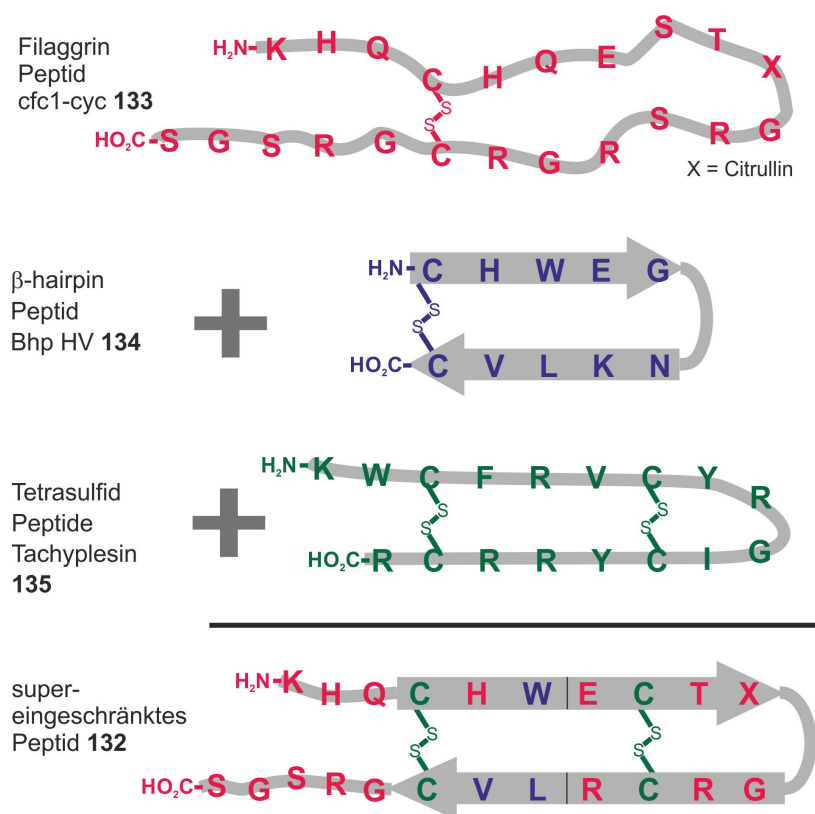
*Enterohämorrhagische Escherichia coli* (EHEC) ist ein pathogener Strang, der blutige Durchfallerkrankungen auslösen kann und nur schwer therapierbar ist.<sup>[368,369]</sup> Eine Behandlung mittels gängiger Antibiotika ist lediglich bedingt durchführbar, da während der Abtötung der Bakterien die Freisetzung von Shiga-Toxinen induziert wird, die zytotoxische Proteine darstellen, welche die Proteinsynthese verhindern. Dies geschieht durch Inhibition der 60S-Untereinheit der Ribosomen.<sup>[370-372]</sup> Antibiotika, die sinnvoll in der Therapie eingesetzt werden können sind bestimmte Makrolide, Rifampicin und Rifaximin, welche die Synthese der Toxine unterdrücken können.<sup>[373,374]</sup> Ebenfalls in der Therapie eingesetzt wurde Eculizumab, ein monoklonaler Antikörper, der die Aktivierung des entsprechenden Komplementsystems verhindern kann.<sup>[375,376]</sup>

Basierend auf der EHEC-Krise 2011 in Europa müssen moderne Antibiotika entwickelt werden, die in der Darmflora eine hohe Selektivität gegenüber dem EHEC-Erreger aufweisen und keine Freisetzung von Toxinen verursachen. Lasso-peptide zeigen bereits ein hohes Potential in ihrer biologischen Aktivität auf und können wie beispielsweise Microcin J25 das Wachstum eines EHEC-Ausbruchstamm inhibieren (siehe Abb. 3.58). Es ist zu erkennen, dass die synthetischen Microcin Derivate **126** - **129** ebenfalls eine Inhibierung des Wachstums hervorrufen. Peptid **129** zeigt in diesem Fall die größte Wirkung. Zusammengefasst lässt sich

sagen, dass auch ohne die korrekte Topologie die in dieser Arbeit synthetisierten Derivate eine biologische Aktivität aufweisen, die aber zum größten Teil noch weit unter der Aktivität des nativen Microcins bleibt.

### 3.14.2 Bestimmung der biologischen Aktivität eines Filaggrin-Derivates

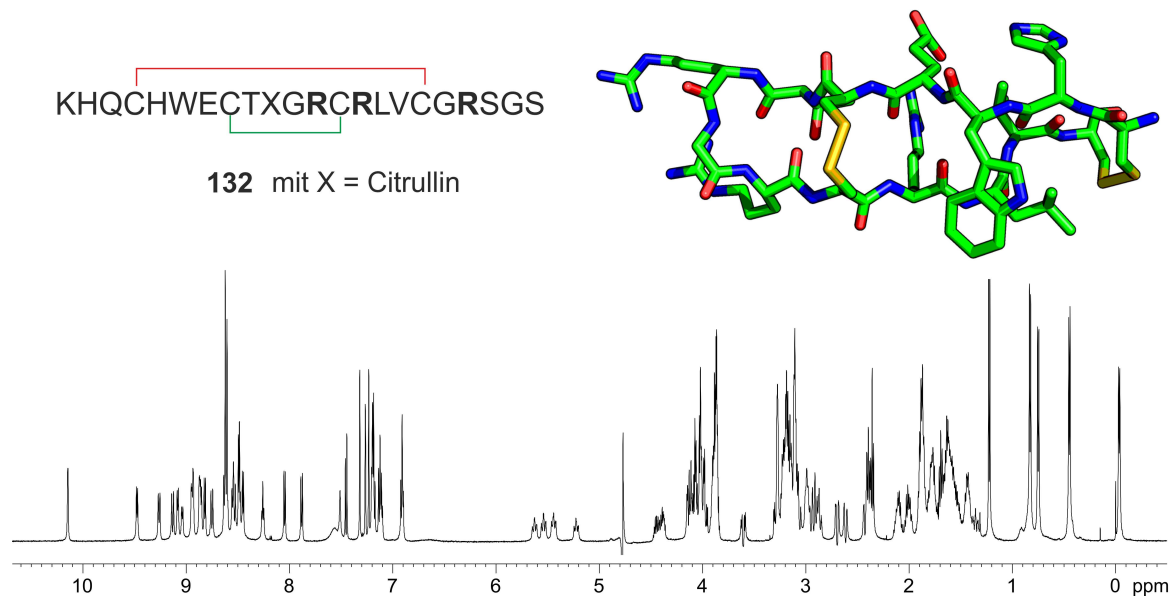
Analog zu den Experimenten der synthetischen Microcin-Derivate wurde ein chimäres, in seiner Konformation stark eingeschränktes Filaggrin-Peptid **132**, das bereits von SABRINA FISCHER im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert wurde, auf die biologische Aktivität gegenüber *gram*-negativen Bakterien hin untersucht. Die Eigenschaften des Peptids entstehen aus einer Addition der Filaggrin-Sequenz **133**, dem rigiden Bhp HV **134** von COCHRAN et al. und dem Tachyplesin-Disulfidmotiv **135** (siehe Abbildung 3.59).<sup>[377,378]</sup>



**Abbildung 3.59** Addition von Eigenschaften durch die Kombination der biologisch aktiven Filaggrin-Sequenz **133**, dem rigiden cyclischen *hairpin*-Peptid Bhp HV **134** und dem Disulfid-Motiv des Tachyplesins **135**. Das in seiner Konformation eingeschränkte Peptid **132** weist neben der Funktion als Rheuma Epitop antimikrobielle Eigenschaften auf.

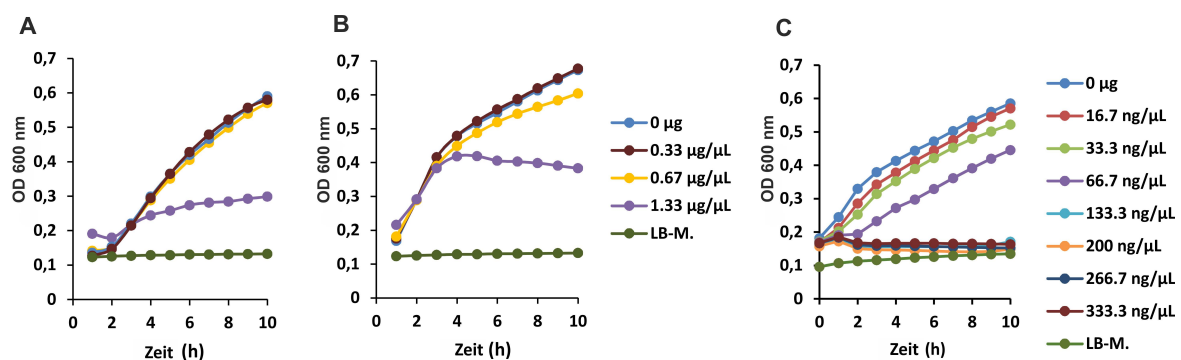
Durch SABRINA FISCHER konnte bereits gezeigt werden, dass das Peptid **132** und einfache Disulfid-Derivate als spezifische Rheuma Epitope genutzt werden können.<sup>[379]</sup> Die bestehende Synthese des Peptids wurde mittels automatisierter Festphasensynthese durch einen *LibertyBlue* der Firma CEM optimiert und an einem Wang-Harz durchgeführt. Nach regioselektiver Oxidation der Cysteine durch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0.3%ig) wurde das Rohpeptid in einer Reinheit von 80% synthetisiert, mittels präparativer HPLC aufgereinigt und ca. 10 mg Peptid als Reinstoff erhalten (siehe Abb. 3.60).





**Abbildung 3.60** Darstellung der Primärstruktur mit entsprechender Disulfidverknüpfung und energieminierte Durchschnittskonformation des zentralen *hairpins* des Tetrasulfids **132** basierend auf NOE-Signalen. Unten gezeigt ist das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer pH 3, D<sub>2</sub>O 9:1). Auffällig sind die α-Kohlenstoffe der Cysteine, die stark tieffeld-verschoben sind (5-6 ppm).

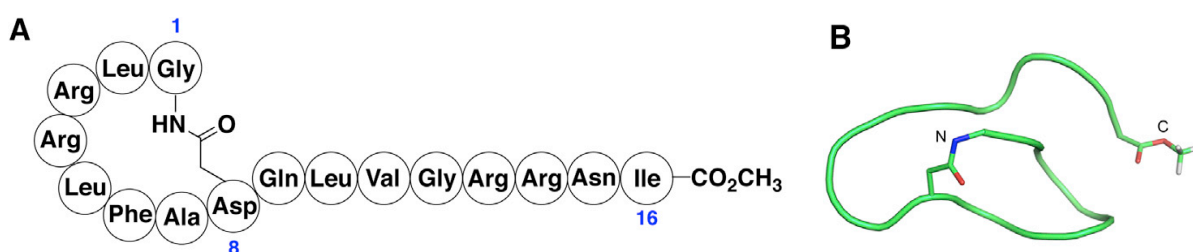
Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurden Wachstumskurven von den bereits in Kapitel 3.14.1 erwähnten Bakterienstämmen unter Einwirkung des chimären Filaggrin-Peptids **132** aufgenommen und die Wachstumshemmung ermittelt. Nur bei den Stämmen *Escherichia coli* DH5α, Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) und *Escherichia coli* AS19 konnte eine Hemmung des Wachstums beobachtet werden (siehe Abb. 3.61). Besonders im Fall des *E. coli* AS19 wurde eine Hemmung im mikromolaren Bereich ermittelt, die für eine antibiotische Aktivität spricht. Die Besonderheit des Bakterienstamms AS19 ist die semi-poröse Membran. Durch diesen Defekt in der Zellwand können kleine Moleküle leichter die Zellwand passieren.



**Abbildung 3.61** Bestimmung der Wachstumskurven der drei unterschiedlichen *E. coli* Stränge **A)** DH5α, **B)** EHEC und **C)** AS19 nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Peptid **132**. **A)** Die Inhibition des Wachstums von DH5α Bakterien beginnt erst ab einer Konzentration von 1,33 mg/mL und liegt im gleichen Bereich wie im Experiment **B)** mit EHEC Bakterien. **C)** Die Wachstumshemmung beginnt bei dem AS19-Strang bereits wesentlich früher mit 66,7 µg/mL und bei Konzentrationen ab 133,3 µg/mL wird das Wachstum vollständig gehemmt.

### 3.15 Studien zur Totalsynthese von Lassomycin

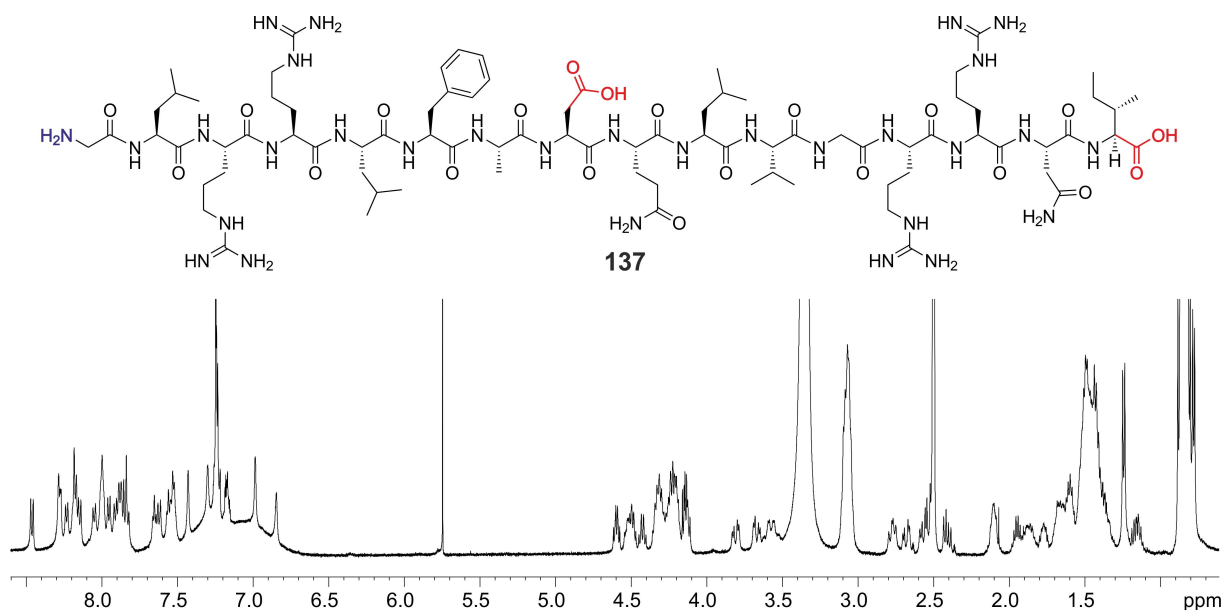
Bei sämtlichen, in dieser Arbeit gezeigten, Lassozeptiden stellt sich nach erfolgreicher Isolierung die Frage der korrekten Topologie. Um diese ermitteln zu können, müssen diverse analytische Methoden wie NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Kristallstrukturanalyse verwendet werden (siehe Kap. 1.1.3). Im Fall des Lassomycins cyclo[GLRRLFAD]QLVGRRNI (**136**) wurde von GAVRISH et al. 2014 eine nicht eingefädelt Struktur postuliert, bei der das C-terminale Ende eng am N-terminalen Ring anliegt, aber nicht durchgefädelt ist (siehe Abb. 3.62).<sup>[380]</sup> Die Strukturaufklärung erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. In den meisten Fällen scheitert die Kristallstrukturanalyse an der schlechten Kristallisierbarkeit der Lassoptide. Es sind bisher nur zwei Lassoptide bekannt, deren Struktur mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde.<sup>[134,166]</sup>



**Abbildung 3.62** A) Primärsequenz des Lassomycins mit post-translationalen Modifikationen. Hervorgehoben sind die Aminosäuren Gly<sup>1</sup> und Asp<sup>8</sup>, die eine Amid-Bindung ausbilden sowie der C-Terminus, der als Methylester vorliegt. B) Vereinfachte Rückgrat-Darstellung der Struktur des Lassomycins. Die Abbildung wurde entnommen aus Gavrish et al. *Chemistry & Biology* **2014**, 21, 509-518, Figure 1.<sup>[380]</sup>

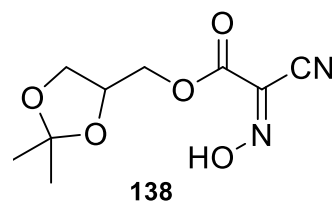
Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde Lassomycin zunächst als lineares Peptid **137** mittels automatisierter Festphasensynthese synthetisiert und NMR-spektroskopisch charakterisiert (siehe Abb. 3.63). Es wird beobachtet, dass die chemischen Verschiebungen der Amid-Protonen sich sehr stark vom nativen Lassomycin **136** unterscheiden. Es kann aber anhand dieser Struktur noch nicht gesagt werden, ob das native Peptid wirklich nicht eingefädelt ist. Zur Überprüfung wurden verschiedene Methoden zur Macrocyclisierung durchgeführt und die entstehenden Produkte auf ihre topologischen Eigenschaften untersucht. Im Rahmen der Macrocyclisierung werden nach Abb. 3.63 zwei Regioisomere erwartet, da beide Carboxyl-Gruppen (rot) für die Acylierung des N-terminalen Glycins zur Verfügung stehen. Bei der Entstehung des kleineren, gewünschten Cyclus können zusätzlich zwei topologische Isomere, deren Identifizierung und Analyse Ziel der Macrocyclisierung ist, entstehen.





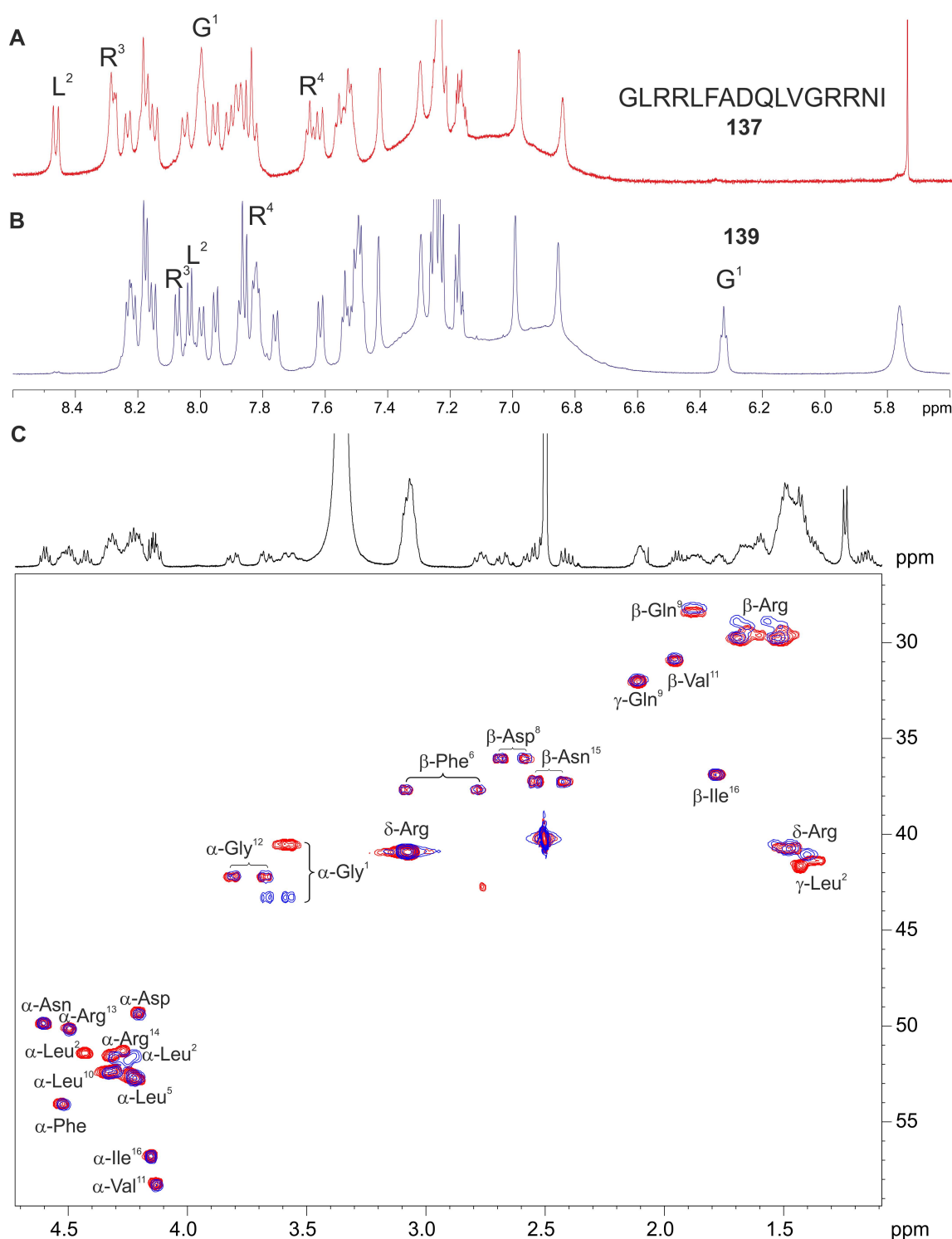
**Abbildung 3.63**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K) des linearen Lassomycins **137**. In der Primärsequenz des Peptids sind das N-terminale Amin (blau) und die Carbonsäuren (rot) hervorgehoben. Die nachfolgende Macrocyklisierung zum Lassomycin ist aufgrund der zwei Carbonsäuren eine Konkurrenzreaktion und wird in Lösung, an der festen Phasen und reversibel durchgeführt.

Das lineare Lassomycin **137** wurde zunächst in Lösung mit Kupplungsreagenzien umgesetzt und mittels HPLC der Reaktionsfortschritt verfolgt. Es zeigte sich, dass jegliche Kombination an Lösungsmitteln ( $\text{DMSO}$ ,  $\text{DMF}$  und  $\text{H}_2\text{O}$ ) und Kupplungsreagenzien (DPPA, HBTU, HATU sowie EDC) zu keinem macrocyclischen Produkt führten. Die Cyclisierung in  $\text{H}_2\text{O}$  mit EDC als Kupplungsreagenz und einem wasserlöslichen Oxyma-Derivat **138** von WANG et al.<sup>[381]</sup> (siehe Abb. 3.64) erzeugte nach 2 d Reaktionszeit einen neuen Peak im HPLC-Chromatogramm, der als Peptid **139** isoliert und  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Im Vergleich mit dem



**Abbildung 3.64** Wasserlösliches Oxyma-Derivat nach WANG et al.<sup>[381]</sup>

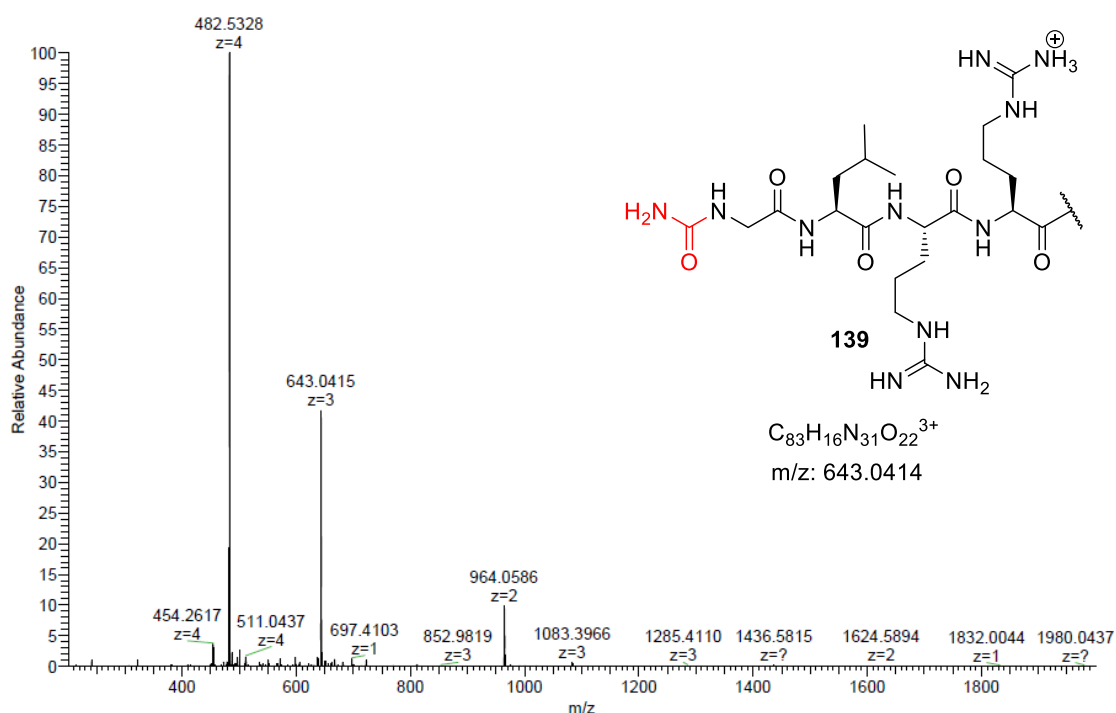
linearen Lassomycin **137** wird beobachtet, dass sich die N-terminalen amidischen Protonen stark in ihrer Verschiebung ändern und bei 5.76 ppm ein neues Heteroatom-gebundenes Signal erscheint, das ein Integral von zwei aufweist und somit nur ein sekundäres Amin oder terminales Amid darstellen kann. (siehe Abb. 3.65). Im Vergleich mit den NMR-spektroskopischen Daten des nativen Lassomycins wird bereits deutlich, dass eine gänzlich andere Struktur erhalten wurde, als erwartet. Zur genaueren Charakterisierung der Verbindung wurden 2D-NMR-Spektren und Massespektren gemessen.



**Abbildung 3.65**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K). **A**) NH-Bereich des linearen Lassomycins **137** mit den hervorgehobenen ersten vier N-terminalen Aminosäuren Gly $^1$ , Leu $^2$ , Arg $^3$  und Arg $^4$ . **B**) NH-Bereich des Reaktionsprodukts **139** der Cyclisierung von linearem Lassomycin **137** ebenfalls mit den ersten vier N-terminalen Aminosäuren. Die Änderung der chemischen Verschiebung dieser NHs unterscheidet sich stark von denen im linearen Peptid, das auf eine Cyclisierung hindeutet. Im HSQC-Spektrum werden hingegen nicht die erwarteten Verschiebungsänderungen des  $\alpha$ - und  $\beta$ -H der Asparaginsäure beobachtet und im NOESY-Spektrum sind keine sequentiellen NOE-Kontakte sichtbar. Zusätzlich kann das breite Singulett bei 5.76 ppm nicht zu dem entsprechenden Macrocyclus zugeordnet werden. **C**) HSQC-Spektren (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K). Erneut in rot dargestellt ist das lineare Peptid **137** und in blau das Reaktionsprodukt **139**. Gut zu erkennen sind die große Ähnlichkeit der  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen abgesehen vom  $\alpha$ -Gly $^1$  sowie  $\alpha$ -Leu $^2$ .

Mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass keine cyclische Struktur erhalten wurde. Der Vergleich der zwei Peptide im HSQC-Spektrum zeigt keine Veränderung in der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoffatome. Vor allem zeigte sich keine Änderung des  $\beta$ -Asp<sup>8</sup> oder  $\alpha$ -Ile<sup>16</sup>, die Aminosäuren in der Nähe der Cyclisierungsposition darstellen. Lediglich die  $\alpha$ -Gly<sup>1</sup> und  $\alpha$ -Leu<sup>2</sup>-Kohlenstoffatome weisen eine nennenswerte Änderung in der chemischen Verschiebung auf (siehe Abb. 3.65). Basierend auf dieser Beobachtung wird ein N-terminales *capping* des Glycins vermutet, das einen vergleichsweise starken Einfluss auf die N-terminalen Aminosäuren ausübt.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Die ermittelte Masse im ESI-HRMS ist mit  $M+43$  größer als erwartet und kann dem N-terminal carbamoylierten Peptid **139** zugeordnet werden (siehe Abb. 3.66). Die Carbamoyl-Gruppe erklärt das zusätzliche Singulett bei 5.76 ppm, das ein NOE-Kontakt zum NH-Gly aufweist, aber keine Korrelation im HSQC-Spektrum zeigt.

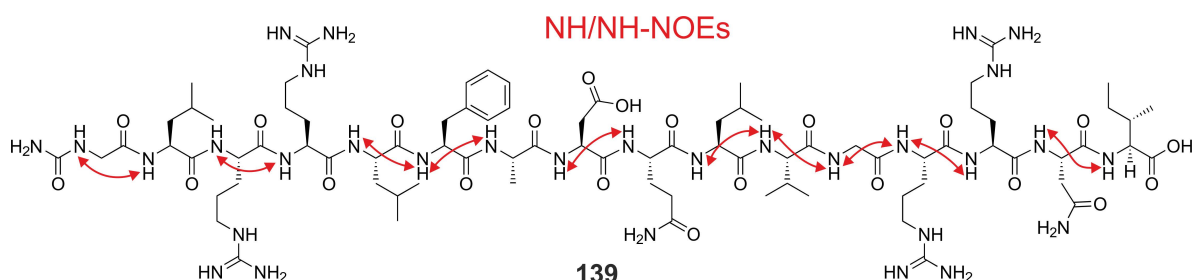


**Abbildung 3.66** Massenspektrometrische Untersuchung des linearen Reaktionsprodukts **139**. Allen drei Peaks konnte dieselbe Summenformel  $\text{C}_{83}\text{H}_{143}\text{N}_{31}\text{O}_{22}$  zugeordnet werden. Dargestellt ist der N-terminale Abschnitt des dreifach protonierten Peptids, welches in rot markiert mit einer Carbamoyl-Gruppe *gecapped* wurde.

Das ungewollte *capping* des N-terminalen Glycins kann anhand der eingestellten Reaktionsbedingungen nicht nachvollzogen werden und muss auf eine Verunreinigung zurückzuführen sein. Beschrieben werden Carbamoylierungen an Peptiden durch Erhitzen der Substrate in Harnstofflösung (6 – 8 M).<sup>[382]</sup> Die erfolgte Reaktion zeigt deutlich, dass unter

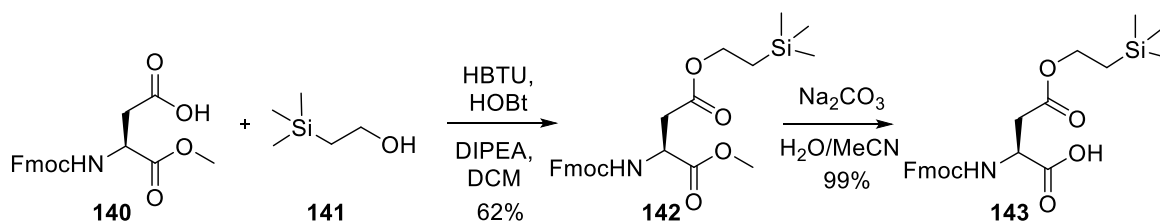
diesen Bedingungen keine Macrocyclisierung erfolgt. Dies ist auf die sterische Abschirmung der Carboxylgruppen oder räumlichen Struktur des Peptids, die keine Cyclisierung zulässt, zurückzuführen.

Im Vergleich mit dem linearen Lassomycin **137** wird beobachtet, dass die carbamoylierte Spezies **139** eine größere Anzahl an NH/NH-NOE-Kontakten aufweist. Das NOE-Muster im amidischen Bereich lässt auf eine helikale Struktur deuten, welche durch die Carbamoyl-Gruppe induziert wird (siehe Abb. 3.67).



**Abbildung 3.67** Darstellung des am N-terminalen Ende carbamoylierten Lassomycins **139**. Durch rote Pfeile sind die NH/NH-NOE-Kontakte dargestellt, die aus dem NOESY-Spektrum ermittelt wurden. Im Vergleich mit dem linearen Lassomycin **137** sind ca. doppelt so viele Kontakte detektiert worden, die auf eine *pre*-helikale Faltung des Reaktionsprodukts **139** deuten. Durch das N-terminale *capping* als Harnstoff wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt.

Im nächsten Schritt wurde der Prozess der Macrocyclisierung auf die feste Phase übertragen. Zur chemoselektiven Entschützung der Carbonsäure in der Seitenkette der Asparaginsäure wurde das Monomer **143** synthetisiert, das eine TMSE-geschützte Carbonsäure aufweist, die sich Fluorid-basiert wieder leicht abspalten lässt (siehe Schema 3.32).



**Schema 3.32** Synthese des TMSE-geschützten Derivats **143** der Asparaginsäure in 61% Ausbeute über zwei Stufen mit einer chromatographischen Aufreinigung. Das Monomer **143** konnte im Gramm-Maßstab synthetisiert und gelagert werden. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte mit TBAF in THF (1 M) an der festen Phase.

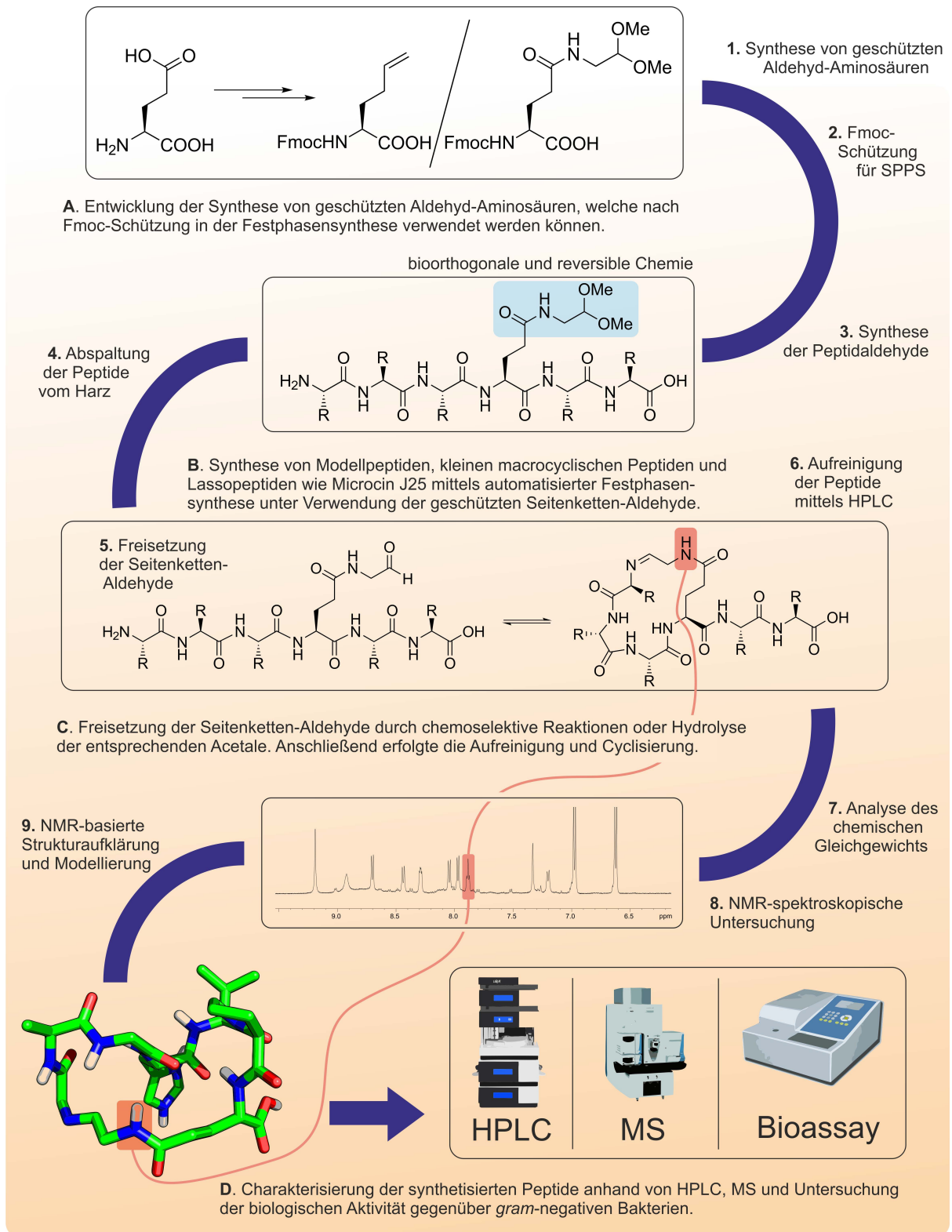
Nach erfolgreicher Peptidsynthese wurde die TMSE- sowie die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen mittels NMR-spektroskopischer Analyse von Abspaltproben verfolgt. Dazu wurde eine geringe Menge an beladenem Harz in einem NMR-Röhrchen mit TFA versetzt, die Suspension nach 1 min mit 500  $\mu$ L DMSO-d<sub>6</sub> verdünnt und NMR-spektroskopisch analysiert. Zunächst konnte der erfolgreiche Einbau der Aminosäure **143** anhand des intensiven Singuletts der TMSE-Gruppe bei -0.04 ppm beobachtet werden, das nach Zugabe von 2.00 eq TBAF (1 M in THF) und Abspaltung des Silylrests wieder verschwindet.

Die nachfolgende mikrowellenunterstützte Cyclisierung des linearen Lassomycins an der festen Phase wurde ebenfalls mit verschiedenen Kupplungsreagenzien durchgeführt (HBTU, DIC, HATU und PyBrop). In keinem Fall konnte eine Macrocyclisierung beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch viele aromatische Schutzgruppen (Pbf, Trt) die Cyclisierungsposition aufgrund von sterischen Effekten nicht zugänglich ist und keine Reaktion stattfindet.

## **4 Zusammenfassung und Ausblick**

Unter den in der Natur üblichen Kettenmolekülen fallen Lasso peptide mit ihrer räumlichen Struktur aus der Rolle. Sie weisen eine cyclische Anordnung auf, die räumlich einem Lasso gleicht und in der Biosynthese unter Verwendung von Enzymen ausgebildet wird. Die Synthese solcher Strukturen stellt eine große Herausforderung in der organisch-synthetischen Chemie dar und konnte bis heute nicht erfolgreich durchgeführt werden. Um die Energiebarriere dieses Cyclisierungsprozesses zu verringern und das Verhältnis zwischen Ring und Kette im Gleichgewicht zu analysieren wurde die Cyclisierung reversibel gestaltet. Dies erfolgte mittels der Substitution einer Amidbindung durch eine Imin- oder Oxim-Bindung, welche die irreversible Macrocyclisierung eines Peptids in einen reversiblen Prozess transformiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bioorthogonale Synthesemethoden für C-terminale und Seitenketten-Peptidaldehyde entwickelt und die Cyclisierungstendenz dieser Peptide sowie die räumliche Anordnung der im Gleichgewicht entstehenden Produkte mittels NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung untersucht. Mittels NMR-basierter, molekularer Modellierung wurden die Peptide analysiert und entsprechende Strukturen berechnet. Die Cyclisierungstendenz von C-terminalen Peptidaldehyden wurde im Rahmen des cyclischen Hexapeptids Segetalin A NMR-spektroskopisch untersucht und entgegen der erwarteten Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung eine Seitenketten-Cyclisierung über das NH-Indol des Tryptophans beobachtet. Neben Segetalin A wurden weitere cyclische Hexapeptide reversibel cyclisiert und deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie analysiert.

Im Gegensatz zur Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung musste für die Kopf-zu-Seitenketten-Cyclisierung neue in der Festphasensynthese einsetzbare Bausteine entwickelt und im Multigramm-Maßstab synthetisiert werden (siehe Abb. 4.1-A). Für die reversible Cyclisierung von Peptidaldehyden über die Seitenkette der Glutaminsäure wurden zwei verschiedene Synthesemethoden durchgeführt und untersucht. Im Rahmen der ersten Syntheseroute, die auf einem Precursor-basierten Ansatz beruht, wurde eine Synthese der unnatürlichen Aminosäure Homoallylglycin und dessen Derivate entwickelt und die oxidative Spaltung des terminalen Olefins zum Aldehyd analysiert. Der zweite Syntheseweg beinhaltete die Synthese eines Seitenketten-Dipeptids, bestehend aus Glutaminsäure und einem geschützten Glycinaldehyd oder einem Glycinaldehyd-Precursor in der Seitenkette. Dies vereinfachte die Synthese der Aldehyd-Aminosäuren erheblich, führte zu höheren Gesamtausbeuten und ergab ein im Multigramm-Maßstab herstellbares, stabiles Aminosäure-Derivat.



**Abbildung 4.1 A)** Die Synthese von geschützten, bioorthogonalen Aldehyd-Aminosäure-Monomeren konnte in vier Stufen mit sehr guten Ausbeuten und einer hohen Reinheit realisiert werden (1 - 2). **B)** Die anschließende Darstellung der geschützten Seitenketten-Peptidaldehyde erfolgte mittels automatisierter Festphasensynthese (3). **C)** Nach Abspaltung der Peptide und Freisetzung des Aldehyds wurden die Peptide mittels HPLC aufgereinigt (4 - 6), charakterisiert und unter reversiblen Bedingungen die Cyclisierung NMR-spektroskopisch analysiert (7 - 8). Es erfolgte die NMR-basierte Strukturaufklärung und die molekulare Modellierung der Peptide (9). Neben der Imin-Bildung wurden weitere reversible Cyclisierungen basierend auf Oximen und Disulfiden durchgeführt und analysiert. **D)** Cyclische Derivate des Lassozeptids Microcin J25 wurden abschließend auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Die Insertion der synthetischen Aminosäure in Peptide erfolgte mittels manueller und automatisierter Festphasenpeptidsynthese (siehe Abb. 4.1-B und C). Sämtliche, auf diese Art hergestellten, Seitenketten-Peptidaldehyde wurden auf ihre Cyclisierungstendenz in wässrigem Phosphatpuffer mittels NMR-Spektroskopie analysiert (siehe Abb. 4.1-D). Die Einstellung des chemischen Gleichgewichts erfolgte bei pH 6.5 in wässrigem Phosphatpuffer, wodurch ein schneller H/D-Austausch stattfand und die NMR-Spektren basierend auf der Signalverbreiterung eine geringe Qualität aufwiesen. Durch reduktive Aminierung wurde die Gleichgewichtsreaktion abgefangen und es konnte gezeigt werden, dass alleine durch intramolekulare Wechselwirkungen keine Lasso-Topologie ähnlich dem Naturstoff erhalten wurde, sondern ausschließlich das cyclisch-verzweigte Peptid. Aufgrund der nicht ausreichenden Vorfaltung innerhalb des linearen Lasso-peptids wurde mit Hilfe einer Disulfidbrücke das C-terminale Ende kovalent an das Rückgrat gebunden, sodass eine mögliche Macrolactamisierung des N-terminalen Rings zu einem korrekt eingefädelten Lasso-peptid führen sollte. In diesem Fall wurde erneut kein topologisch korrektes Lasso-peptid erhalten. Es wurde für die reversible Cyclisierung des N-terminalen Rings eine weitere Disulfidbrücke eingeführt, die die Amidbindung ersetzt, aber die native Ringgröße nicht verändert. Durch orthogonal geschützte Cysteine, die flexibel in der Primärsequenz substituiert wurden, konnten unterschiedliche Disulfidmuster synthetisiert und analysiert werden. Die synthetisierten Di- und Tetrasulfide, welche die höchste Analogie zum nativen Microcin J25 aufwiesen, wurden auf ihre biologische Aktivität untersucht. Unter Zugabe der synthetischen Peptide wurden Wachstumskurven von *gram*-negativen Bakterien wie *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC)* und *Escherichia coli AS19* gemessen und die Wachstums-inhibierende Wirkung analysiert. Im Gegensatz zum nativen Microcin J25 zeigten die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide keine ausgeprägte biologische Aktivität.

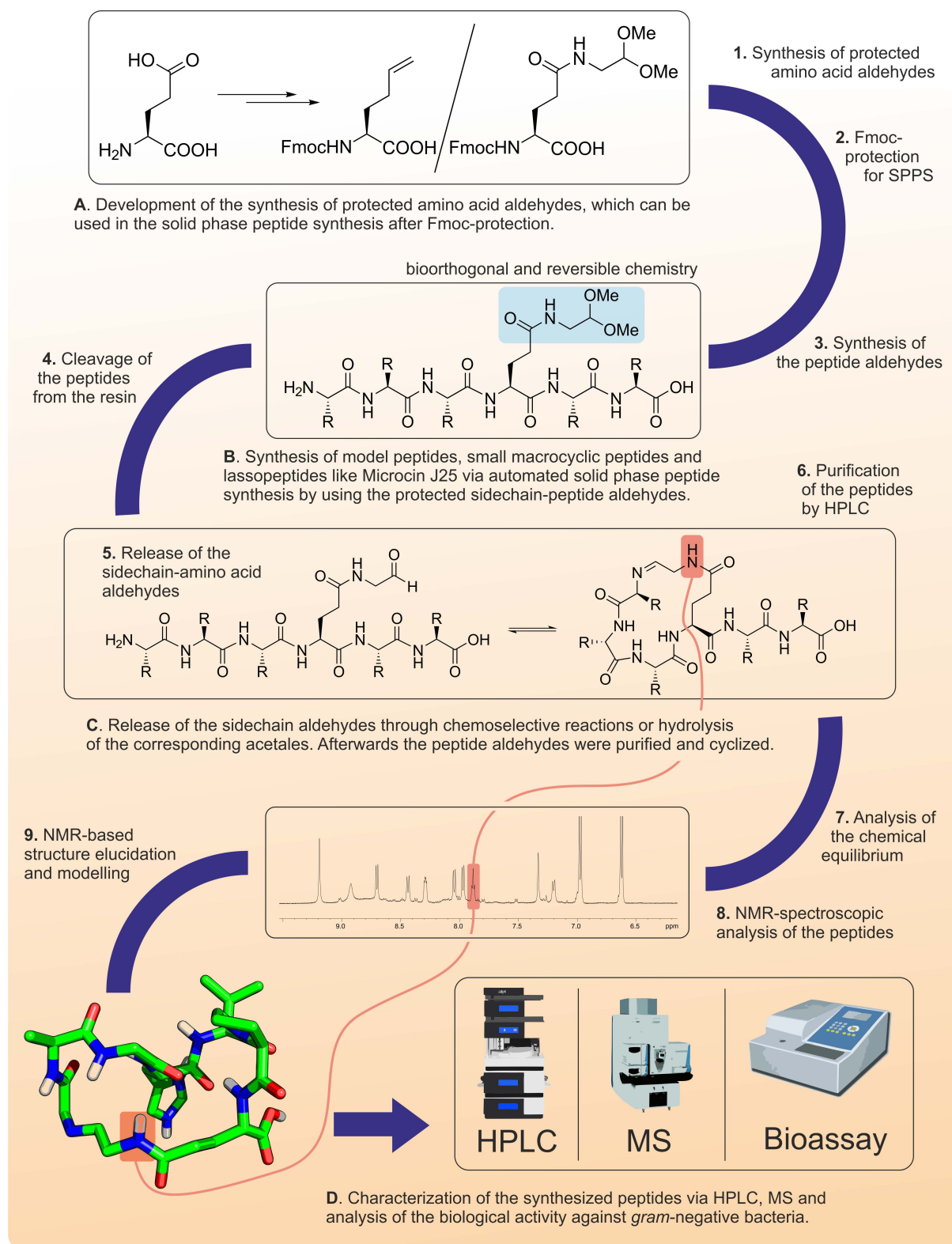
Die reversible Macrocyclisierung der Lasso-peptide könnte in weiterführenden Arbeiten um die Ketoxim-Ligation, die bereits in kleineren Systemen angewendet wurde, erweitert werden. Ebenfalls interessant wäre zur Untersuchung der Einfädelung des Microcin J25 eine inverse Strategie, indem der Entfädelungsprozess eingehender untersucht wird. Ein weiterer Aspekt wäre die Synthese von Lasso-peptiden, die nicht Teil dieser Arbeit waren, im Rahmen der reversiblen Imin-Cyclisierung und der Knüpfung von weiteren Disulfidbrücken.



## 5 Summary and Outlook

Lasso peptides have a very unique structure which is not comparable with structurally simpler biopolymers found in nature. The formed cyclic structure can be described by the macroscopic form of the eponymous lasso and is synthesized in nature by enzymes. The synthesis of such structures is a major challenge in organic-synthetic chemistry and until now there is no synthetic procedure known which leads to the correct topological isomer. To reduce the energy barrier of this cyclization process and to analyze the ratio between the macrocycle and the chain in the chemical equilibrium we performed the cyclization in a reversible manner. This was achieved by the substitution of a peptide bond for an imine or oxime which transforms irreversible macrocyclization into a reversible process. In this work bioorthogonal synthetic methods for C-terminal and sidechain peptide aldehydes were developed. The cyclization tendency of these peptides as well as the spatial arrangement of the cyclic products, formed in chemical equilibrium, were analyzed in buffered solution by NMR-spectroscopy. By means of NMR-based molecular modelling the peptides were evaluated and the corresponding structures calculated. The cyclization tendency of C-terminal peptide aldehydes was examined for the cyclic hexapeptide Segetalin A by NMR-spectroscopy. Instead of the expected head-to-tail cyclization the sidechain cyclization of the Trp-NH-indole was observed. Besides Segetalin A, several additional cyclic hexapeptides were cyclized reversibly and their structures characterized by NMR-spectroscopy.

In contrast to the head-to-tail cyclization novel monomers for the head-to-sidechain cyclization had to be developed and synthesized in multi gram scale for the use in solid phase peptide synthesis (see Fig. 5.1-A). For the reversible cyclization of peptide aldehydes via the sidechain of glutamic acid two different synthetic routes were performed and analyzed. The first route which was focused on a precursor-based strategy involved the synthesis of the unnatural amino acid homoallylglycine. Derivatives of this amino acid were prepared and the oxidative cleavage of the terminal olefin to the corresponding aldehyde was investigated. The second synthesis route fashioned a sidechain dipeptide consisting of glutamic acid and a protected glycinal or glycinal precursor in the sidechain was performed. This significantly simplified the synthesis of the amino acid aldehydes, led to higher overall yields and a stable amino acid derivative which is synthesizable in a multi gram scale.



**Figure 5.1** The synthesis of protected, bioorthogonal amino acid aldehydes was realized in four steps with a very high overall yield with high purity (1 - 2). **B**) The following preparation of the protected sidechain-peptide aldehydes was performed by automated solid phase peptide synthesis (3). **C**) After resin cleavage and the release of the aldehyde moiety the peptide aldehydes were purified via preparative HPLC (4 - 6), characterized and the chemical equilibrium between the aldehyde and the imine was analyzed by NMR-spectroscopy (7 - 8). The formed cyclic peptides were examined and based on the obtained NMR data a structure elucidation was performed, which led to the molecular modelling of the structures (9). Besides the imine formation several reversible cyclization strategies based on oximes and disulfides were performed and analyzed. **D**) Cyclic derivatives of the lasso peptide Microcin J25 were tested in more detail in regard to their biological activity against *gram*-negative bacteria.

The insertion of the synthetic amino acid in peptides was performed by manual and automated solid phase peptide synthesis (see Fig. 5.1-B and C). All sidechain peptide aldehydes which were synthesized in this way were analyzed by their cyclization tendency in buffered solution by NMR-spectroscopy (see Fig. 5.1-D). The establishment of the chemical equilibrium was achieved at pH 6.5 in buffered solution whereby a fast H/D exchange occurred. Because of the resulting signal broadening the quality of the measured NMR-spectra was too low for a complete assignment of the signals. By reductive amination of the reactive imines the equilibrium was shifted and the obtained macrocyclic peptides could be analyzed more easily. The analysis showed that the intramolecular interactions itself were not sufficient to form the correct lasso topology, only cyclic-branched peptides were isolated. Based on the insufficient pre-folding of the linear lasso peptide the C-terminal end was linked to the backbone by a disulfide bridge. The performed macrocyclization of the N-terminal ring should then lead to the correct folded lasso peptide. The isolation of the topologically correct peptide failed either. For the reversible cyclization of the N-terminal ring an amide bond was replaced by another disulfide bridge. By orthogonal protected cysteines which could be flexibly substituted in the primary sequence different disulfide patterns were synthesized and analyzed. The biological activity of the synthesized di- and tetrasulfides which showed the strongest similarity to the native Microcin J25 was investigated. Growth curves of gram-negative bacteria like *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, *enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)* and *Escherichia coli AS19* were measured in the presence of the synthetic peptides and their growth-inhibitory activity were characterized. In contrast to the native Microcin J25 the biological activity of the synthetic peptides was quite low.

In future works, the reversible macrocyclization of lasso peptides could be extended by the ketoxime ligation, which has already been described in this work for smaller systems. Another interesting approach for the investigation of the correct threading of Microcin J25 would be an inverse strategy in which the process of unthreading could be analyzed in more detail. Furthermore the developed reversible cyclization strategy could be applied to one of the numerous other lasso peptides, which were not part of this work.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeine Anmerkungen

#### Lösungsmittel und Reagenzien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destillativ gereinigt, absolute Lösungsmittel unter Standardmethoden getrocknet und über Molsieb ( $3 \text{ \AA}$ ,  $w = 20\%$ ) gelagert.<sup>[383]</sup> In der Peptidsynthese eingesetztes DMF und Piperidin wurde kommerziell und in der Reinheit „*peptide grade*“ erworben. Alle weiteren kommerziell erworbenen Reagenzien wurden ohne zusätzliche Aufarbeitung in der Synthese verwendet.

Luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden nach Ausheizen der Apparatur mit einem Heißluftföhn ( $630 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) unter Verwendung von Argon und Stickstoff als Schutzgas durchgeführt.

#### Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 Aluminium-DC-Fertigplatten der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte dabei mittels UV-Absorption/Fluoreszenzextinktion unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254 \text{ nm}$  oder durch Anfärben der DC-Platten mit verschiedenen Färbereagenzien. Für die entsprechenden Farbreaktionen wurden die DC-Platten in die jeweilige Färbelösung eingetaucht und anschließend mit einem Heißluftföhn erhitzt.

Ninhydrin-Lösung: 350 mg Ninhydrin, 100 mL *n*-Butanol, 4 mL Eisessig

Mostain-Lösung: 20 g Ammoniummolybdat, 0.4 g Cer(IV)sulfat, 400 mL Schwefelsäure (10%ig)

KMnO<sub>4</sub>-Lösung: 20 g Kaliumcarbonat, 3 g Kaliumpermanganat, 300 mL H<sub>2</sub>O, 5 mL Natronlauge (10%ig)

#### Flash-Chromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Pressluft- oder Stickstoff-Überdrucks.

#### Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektren in dieser Arbeit wurden an den folgenden Geräten aufgenommen:

- *Bruker AV 300* für <sup>1</sup>H (300.13 MHz) und <sup>13</sup>C (75.4 MHz) Routinemessungen

- *Bruker DRX 500* für  $^1\text{H}$  (500.13 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125.76 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln sowie Temperaturreihen in wässrigem Phosphatpuffer mithilfe der *presat*-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung
- *Bruker AV 600* für  $^1\text{H}$  (600.13 MHz) und 2D-Spektren der Peptide mittels *WATERGATE*-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung

Die Messungen am *DRX 500* wurden ausschließlich von Mitarbeitern der NMR-Abteilung durchgeführt, hingegen Messungen am *AV 600* meist selbst durchgeführt wurden. Am *AV 300* erfolgten die Routinemessungen durch einen automatischen Probenwechsler. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in *parts per million* (ppm) angegeben und wurden aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen. Aufgeführte Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben und als interner Standard diente das Restlösungsmittelsignal des verwendeten Lösungsmittels ( $\text{DMSO}_{\text{d}5\text{H}}$ :  $^1\text{H}$ :  $\delta = 2.50$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 39.52$  ppm;  $\text{MeOH}_{\text{d}2\text{H}}$ :  $^1\text{H}$ :  $\delta = 3.31$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 49.00$  ppm). Bei Messungen in Phosphatpuffer/ $\text{D}_2\text{O}$  (9:1) wurde als Standard  $\text{TSP}_{\text{d}4}$  zugegeben (Resonanzsignal  $^1\text{H}$ :  $\delta = 0.00$  ppm).

Die angegebenen Daten sind phänomenologisch, das heißt sie entsprechen der Erscheinung des Signals und nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität. Des Weiteren bedeutet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett eines Dubletts und ddd = Dublett eines Doppeldubletts. Diastereotope Protonenpaare, deren stereochemische Zuordnung nicht möglich war, wurden mit  $\text{CH}_{\text{diast.}}$  bezeichnet. Die Lösungsmittelsignale sowie die Resonanzsignale des Wassers wurden in den abgebildeten Spektren nicht beschriftet ( $d = 3.33$  ppm für  $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ ). Die korrekte Zuordnung der Protonensignale erfolgte mit Hilfe von 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, TOCSY, ROESY/NOESY und HSQC).

### Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung an einem *Finnigan LTQ-FT* Massenspektrometer der Firma *Thermo Fischer Scientific* aufgenommen. Sämtliche gemessenen Spektren wurden mit der Elektrospray-Ionisations-Methode (ESI) aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Masse-zu-Ladung-Verhältnisse und entsprechen jeweils den Massen der Isotope mit der größten natürlichen Häufigkeit. Peptide mit einer Molekülmasse ab 2 kDa wurden zur erfolgreichen Detektion mittels HPLC-MS (*Agilent 1100 Series*) vermessen.

### UV/VIS-Spektroskopie

Für die Ermittlung der Harzbeladung wurde die Absorption der Abspalllösung an einem *DU 800* der Firma *Beckman Coulter* in PE-Einmalküvetten ( $d = 1$  cm) bestimmt.

### CD-Spektroskopie

Die Bestimmung der CD-Absorption erfolgte an einem *JASCO J-810* CD-Spektrometer unter Verwendung einer *HELMA* QS Quarzglasküvette ( $d = 0.2$  cm). Die Bandweite betrug 1 nm, die Ansprechzeit 2 s und die Vorschubgeschwindigkeit 100 nm/min. Die Spektren wurden als Durchschnitt von fünf Messungen erhalten. Die Peptide wurden in wässrigem Phosphatpuffer (10 mM, pH 3) bei unterschiedlichen Konzentrationen gelöst und vermessen.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC Messungen wurden an einer *Summit*-Anlage der Firma *Dionex* mit DAD-Detektor und einer *P680 dual gradient pump* der Firma *Dionex* oder alternativ an einer *UltiMate 3000 UHPLC<sup>+</sup> focused* von *Thermo Scientific* bei Raumtemperatur durchgeführt. Analytische Messungen wurden mit einer *ACE 3 C<sub>18</sub>*-Säule (3  $\mu$ m, 3 mm x 150 mm) durchgeführt. Für semipräparative Trennungen wurde eine *ACE 5 C<sub>18</sub>*-Säule (5  $\mu$ m, 7.75 mm x 150 mm) verwendet. Sowohl für analytische Messungen als auch für semipräparative Trennungen wurden die Proben mithilfe des Autosamplers *ASI-100* injiziert. Die präparative Aufreinigung erfolgte an einer *UltiMate 3000 UHPLC<sup>+</sup> focused* der Firma *Thermo Scientific* mit der C<sub>18</sub>-Säule *VP125/21 Nucleodur C18 gravity* der Firma *Macherey-Nagel*. Als Laufmittel kamen Mischungen aus A = Wasser + 0.1% TFA und B = Acetonitril + 0.085% TFA zum Einsatz. Die jeweiligen Gradienten sind bei der Beschreibung der einzelnen Verbindungen angegeben. Die angegebenen Retentionszeiten  $t_R$  entsprechen der absoluten und nicht der Netto-Retentionszeit, da kein Totzeitmarker verwendet wurde.

## 6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Festphasenpeptidsynthese

Alle Festphasenpeptidsynthesen wurden basierend auf der Fmoc/Boc-Strategie in DMF durchgeführt. Für die manuelle Peptidsynthese an der festen Phase wurde ein 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz (2-CTC, 200-400 mesh, 1% DVB, Kapazität = 1.60 mmol/g) als Trägermaterial verwendet. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur und mittels Durchmischung der Suspension in einer Umkehrfritte im Stickstoffstrom durchgeführt. Erforderliche Waschschritte zwischen der Kupplung und Fmoc-Abspaltung wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Fall der C-

terminalen Peptidaldehyde wurde ein TentaGel-Polystyrolharz verwendet, das PEG-Seitenketten in den Vernetzungen enthält. Bei der automatisierten, mikrowellenunterstützten Festphasensynthese wurde ebenfalls 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz oder vorbeladenes Wang-Polystyrolharz (100-200 *mesh*, 1% DVB, Beladung = ~0.60 mmol/g) verwendet. Im Fall des 2-CTC-Harzes wurden die Synthesen bei 50 °C, mit Wang-Harz bei 90°C durchgeführt. Die Peptidsynthesen wurden standardmäßig in einer Ansatzgröße von 0.10 mmol durchgeführt. Die weiteren Arbeitsvorschriften beziehen sich auf die manuelle Festphasenpeptidsynthese. Auf die automatisierte Synthese wird im weiteren Verlauf nochmals separat eingegangen.

### 6.2.1 Beladung des 2-Chlortritylchlorid-Harzes

Die zu beladene Menge 2-Chlortritylchlorid-Harz (~1 g) wurde in einer Umkehrfritte 30 min in DMF gequellt. Nach Waschen des Harzes mit DCM und MeOH wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (1.50 eq) und DIPEA (5.0 eq) in DMF (5 – 10 mL) gelöst und zu dem Harz gegeben. Die Suspension wurde für 30 bis 60 min im Stickstoffstrom durchmischt. Die Reaktionslösung wurde anschließend abfiltriert und das beladene Harz mit DMF/MeOH/DCM jeweils dreimal gewaschen. Um verbliebene aktive Beladungsstellen zu besetzen, wurde eine Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) zugegeben und für 30 min durchmischt. Dieses wurde zweimal durchgeführt. Nach vollständigem *Cappen* der freien Beladungsstellen wurde das Harz erneut, wie bereits beschrieben, gewaschen. Nach Trocknen *in vacuo* wurde die Beladung des Harzes anhand von UV/VIS-Spektroskopie ermittelt. Eine bestimmte Menge Harz (~2 mg) wurde mit Piperidin-Lösung (1.0 mL, 25% in DMF) versetzt, wodurch die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde und ein Fluoren-Derivat gebildet wird. Die Suspension wurde nach 30 min mit MeOH (5.0 mL) verdünnt und die Absorption des Fluoren-Derivats bei 289 und 301 nm gemessen. Die entsprechende Beladung des Harzes wurde anhand von Formel 6.1 ermittelt.

$$B \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{E \cdot V[\text{mL}]}{\varepsilon[\text{mL}/\text{mmol} \cdot \text{cm}] \cdot d[\text{cm}] \cdot m_{\text{Harz}}[\text{g}]}$$

**Formel 6.1** B = Harzbeladung, E = Extinktion, V = Gesamtvolumen,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Küvette, m = Masse des Harzes.

Im Fall der C-terminalen Peptidaldehyde wurde ein mit Threonin und Glycin vorbeladenes TentaGel®-Harz verwendet. Der entsprechende Fmoc-geschützte Aminosäurealdehyd (5.0 eq) wurde in DCM/MeOH (1:1) mit AcOH (1%) gelöst und für 4 h bei RT inkubiert. Das entstehende Oxazolidin wurde mit DMF/THF/DCM jeweils dreimal gewaschen, mit Boc<sub>2</sub>O

(5.0 eq) und NMM (5.0 eq) in THF bei 50 °C inkubiert. Nach abschließendem Waschen mit DMF/THF/DCM wurden die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung der Aminosäuren wie folgt durchgeführt:

### **6.2.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe**

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das jeweilige beladene Harz zunächst für 30 min in DMF gequellt und anschließend mit einer Piperidin-Lösung (5 mL, 25% in DMF) versetzt. Die Lösung wurde nach 10 min Reaktionszeit abfiltriert und der Vorgang wiederholt. Abschließend wurde jeweils dreimal mit DMF/MeOH/DCM gewaschen und mit der Kupplung der nächsten Aminosäure begonnen oder das Peptid vom Harz abgespalten.

### **6.2.3 Kupplung der Aminosäuren**

Das beladene, Fmoc-entschützte und in DMF gequellte Harz wurde mit einer Lösung aus Fmoc-geschützter Aminosäure (3.0 eq) und HOBt (3.0 eq) in DMF (2 mL) versetzt. DIPEA (10.0 eq) und HBTU (3.0 eq) wurden, gelöst in DMF (1 mL), zugegeben. Die Suspension wurde für 60 min im Stickstoffstrom durchmischt und zwischendurch der pH-Wert überprüft und, falls nötig, weiteres DIPEA hinzugegeben. Die Lösung wurde abfiltriert und das Harz mit DMF/MeOH/DCM jeweils dreimal gewaschen. Es folgte die nächste Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Die Arbeitsvorschriften 6.2.2 und 6.2.3 wurden je nach Peptidsequenz mehrfach wiederholt. Bei längeren Peptiden erhöhte sich ab der zehnten Aminosäure die Reaktionszeit auf 90 min.

### **6.2.4 Abspaltung des Peptids vom Harz und Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen**

Nach erfolgreicher Peptidsynthese wurde das Harz zur Abspaltung des Peptids mit Trifluoressigsäure (95%ig in H<sub>2</sub>O) versetzt. Für Peptidsequenzen mit einem hohen Anteil an seitenkettengeschützten Aminosäuren wurde die Abspatlösung zu TFA/Wasser/Phenol/TIPS (88:5:5:2) verändert, bekannt als Abspatlösung B.<sup>[384]</sup> Die Additive dienen zum Abfangen von abgespaltenen, reaktiven Schutzgruppen (Trt, *t*Bu und Pbf). Peptide ohne Seitenkettenschutzgruppen wurden innerhalb von 30 min vollständig abgespalten, mit Seitenkettenschutzgruppen erhöhte sich die Reaktionszeit auf 2 – 3 h. Peptide, welche in der Seitenkette eine Aldehydgruppe aufweisen, wurden mit einer variierten Abspatlösung C aus TFA/Anisol/Thioanisol/H<sub>2</sub>O (85:5:5:5) abgespalten.<sup>[235]</sup> Dadurch wird die spontane Reduktion des Aldehyds verhindert, die sonst durch die Anwesenheit von TIPS auftritt. Die Abspatlösung wurde abfiltriert, in absoluten, abgekühlten Diethylether getropft und



zentrifugiert. Der überstehende Diethylether wurde abdekantiert und der Rückstand mit weiterem Diethylether gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Rückstand *in vacuo* getrocknet, abschließend in einer Mischung aus Wasser/MeCN (20 mL, 4:1) gelöst und lyophilisiert. Verwendet wurde eine Lyophylle des Typs *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ*. Im Fall der C-terminalen Peptidaldehyde wurden zunächst mit wasserfreier TFA die Boc-Schutzgruppen sowie weitere, säurelabile Seitenketten-Schutzgruppen abgespalten. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Die Abspaltung des Peptidaldehyds erfolgte anschließend über 30 min mit DCM/MeOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (63:22:10:5) bei RT. Die weitere Aufarbeitung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

### 6.2.5 Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden

Zu Beginn der Promotion wurde die automatische Festphasenpeptidsynthese an einem *Apex 360* Synthesizer der Firma *Advanced ChemTech* durchgeführt. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte in 60 min mit jeweils 3.0 eq Aminosäure, HBTU, HOBt und 7.0 eq DIPEA. Jede Kupplung wurde als *double coupling* durchgeführt, die jeweilige zweite Kupplung wurde mit 1.0 eq Aminosäure, HOBt, HBTU und 2.3 eq DIPEA in 50 min durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit Piperidin (25% in DMF) für 5 und 10 min. Sowohl nach der Entschützungs- als auch nach der Kupplungsreaktion wurde zweimal mit DMF, zweimal mit DCM und zweimal mit DMF gewaschen.

Ab Mitte der Promotion konnte zusätzlich ein *LibertyBlue* Peptidsynthesizer der Firma *CEM* verwendet werden. Dieser ermöglichte eine mikrowellenunterstützte Synthese der Peptide in sehr kurzer Zeit mit weniger Lösungsmittelaufwand. Basierend auf den unterschiedlichen Stabilitäten der verwendeten Linker auf den Polystyrolharzen wurden die Peptide nach zwei Standard-Protokollen synthetisiert.

### Automatisierte Peptidsynthese am *LibertyBlue* mit 2-CTC-Harz

- Fmoc-Abspaltung:  $T = 50\text{ °C}$  (30 W), 3 min, Piperidin (20%ig in DMF)
- Kupplung der Aminosäuren:
  - Alle Aminosäuren außer Fmoc-Arg(Pbf)-OH:  
 $T = 50\text{ °C}$  (30 W), 10 min, DIC/Oxyma mit 5.0 eq
  - Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH:  
 $T = 25\text{ °C}$  (0 W), 25 min;  $T = 50\text{ °C}$  (30 W), 10 min, DIC/Oxyma mit 5.0 eq
- Waschen: 3 x mit DMF nach Fmoc-Abspaltung

Die Vorteile des 2-CTC-Harzes sind die größere Erfahrung durch manuelle Synthese, die bereits breite Anwendung und hohe Verfügbarkeit im Arbeitskreis sowie monetäre Gründe. Der größte Nachteil ist die zu labile Anbindung des Peptids, wodurch eine Reaktionstemperatur von nur  $50\text{ °C}$  realisierbar ist.

### Automatisierte Peptidsynthese am *LibertyBlue* mit Wang-Harz

- Fmoc-Abspaltung:  $T = 75\text{ °C}$  (155 W), 15 sec;  
 $90\text{ °C}$  (30 W), 30 sec, Piperidin (20%ig in DMF)
- Kupplung der Aminosäuren:
  - Alle Aminosäuren außer Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH und Fmoc-Cys(Trt)-OH:  
 $T = 75\text{ °C}$  (170 W), 15 sec;  $T = 90\text{ °C}$  (30 W), 110 sec, DIC/Oxyma mit 5.0 eq
  - Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH:  
 $T = 25\text{ °C}$  (0 W), 25 min;  $T = 75\text{ °C}$  (30 W), 2 min, DIC/Oxyma mit 5.0 eq
  - Kupplung von Fmoc-His(Trt)-OH und Fmoc-Cys(Trt)-OH:  
 $T = 25\text{ °C}$  (0 W), 2 min;  $T = 50\text{ °C}$  (35 W), 8 min, DIC/Oxyma mit 5.0 eq
- Waschen: 3 x mit DMF nach Fmoc-Abspaltung

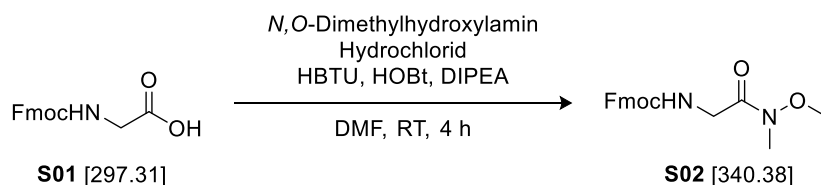
Aufgrund der höheren Reaktionstemperatur, der schnelleren Reaktionszeit und der damit verbundenen höheren Grundreinheit ist der finanzielle Mehraufwand gerechtfertigt. Die Abspaltung der in der automatisierten Festphasensynthese hergestellten Peptide erfolgte analog zu der manuellen Abspaltung in einer Umkehrfritte.

### **6.2.6 Oxidation von Cystein-haltigen Peptiden**

Die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der synthetisierten Peptide erfolgte nach Abspaltung der Peptide vom Harz in Lösung und nicht, wie ebenfalls möglich, an der festen Phase.<sup>[345,346,348]</sup> Die erhaltenen, lyophilisierten Peptide wurden in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (10 mM, pH 7.4) aufgenommen, sodass die Konzentration der Lösung 0.1 mM betrug. Die Lösung wurde in einem offenen Kolben stark gerührt, um durch vorhandenen Luftsauerstoff die Cysteine zu Cystin zu oxidieren. Suspensionen von schlecht löslichen Peptiden wurden mit wenig Acetonitril versetzt, bis eine klare Lösung entstand. Die Reaktion wurde via HPLC verfolgt und nach vollständigem Umsatz lyophilisiert. Peptide, die nach mehrtägiger Oxidation keinen vollständigen Umsatz zeigten, wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0.3%ig) versetzt. Im Falle der doppelten Disulfide wurden die Cysteine in der Seitenkette orthogonal mit Trt und Acm geschützt. Dies hatte den Vorteil, dass die Acm-Schutzgruppe mit der bereits beschriebenen Abspalllösung B nicht entfernt wurde und die Cysteine nicht oxidiert werden konnten. Nach Bildung der ersten Disulfidbrücke wurde die zweite Brücke selektiv durch oxidative Abspaltung der Acm-Schutzgruppen mit elementarem Iod gebildet. Das disulfidverbrückte Peptid wurde in AcOH/H<sub>2</sub>O (1:3) gelöst und mit einer Lösung aus Iod (2.0 eq) in Acetonitril (5 mL) versetzt, sodass eine Konzentration von 0.1 mM erhalten wurde. Die Reaktionslösung wurde nach 1 h Rühren lyophilisiert und das Rohpeptid über präparative HPLC aufgereinigt (siehe Kapitel 6.1).

## 6.3 Synthese der Aminosäure-Bausteine

### 6.3.1 Fmoc-Glycin-*N,O*-Dimethylhydroxamsäure (S02)



Fmoc-Glycin-OH ( <b>S01</b> ) [297.31]	1.00 eq	6.29 mmol	1.87 g
<i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin · HCl [97.55]	2.60 eq	16.4 mmol	1.60 g
HBTU [379.25]	1.10 eq	6.92 mmol	2.62 g
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.10 eq	6.92 mmol	1.06 g
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.60 eq	16.4 mmol	2.78 mL

Zu einer Lösung von Fmoc-Gly-OH (**S01**, 1.87 g, 6.29 mmol, 1.00 eq) in DMF (20 mL) wurden bei RT HBTU (2.62 g, 6.92 mmol, 1.10 eq), HOBT · H<sub>2</sub>O (1.06 g, 6.92 mmol, 1.10 eq), DIPEA (2.78 mL, 16.4 mmol, 2.60 eq) und *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (1.60 g, 16.4 mmol, 2.60 eq) gegeben. Nach Rühren der Reaktion für 12 h wurde die Lösung mit EtOAc (200 mL) verdünnt, dreimal mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5%ig, 100 mL), zweimal mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL) und dreimal mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurde das *Weinrebamid* **S02** in quantitativer Ausbeute (2.12 g, 6.24 mmol) als ölig, hellgelber Feststoff erhalten.

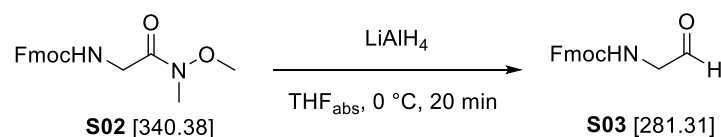
**DC:**  $R_f = 0.62$  (EtOAc/Toluol 7:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 3.09$  (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (d, 2H, <sup>3</sup> $J = 5.8$  Hz,  $\alpha$ H), 4.20-4.30 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.31-7.44 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 7.48 (t, 1H, <sup>3</sup> $J = 6.1$  Hz, NH), 7.72 (d, 2H, <sup>3</sup> $J = 7.7$  Hz, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 7.90 ppm (d, 2H, <sup>3</sup> $J = 7.3$  Hz, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 32.1$  (NCH<sub>3</sub>), 41.1 ( $\alpha$ CH), 46.6 (Fmoc-CH), 61.1 (OCH<sub>3</sub>), 65.7 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1, 125.2, 127.0, 127.6 (jeweils Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 140.7, 143.8 (jeweils Fmoc-C<sub>arom.</sub>) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>]: 363.1315, gef.: 363.1313.

## 6.3.2 Fmoc-Glycin-CHO (S03)



Weinrebamid ( <b>S02</b> ) [340.38]	1.00 eq	3.23 mmol	1.10 g
Lithiumaluminiumhydrid [37.95]	2.50 eq	8.08 mmol	306 mg

Eine Lösung von Fmoc-Glycin-*N,O*-Dimethylhydroxamsäure (**S02**, 1.10 g, 3.23 mmol, 1.00 eq) in THF<sub>abs</sub> (10 mL) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde LiAlH<sub>4</sub> (306 mg, 8.08 mmol, 2.50 eq) in kleinen Portionen über 15 min unter starkem Rühren zugefügt. Nach vollständiger Zugabe wurde für 5 min bei 0 °C gerührt, mit EtOAc (10 mL), Zitronensäure (10%ig, 10 mL) verdünnt und für weitere 15 min bei RT gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc (10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O (100 mL) und HCl (2 N, 100 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde die Lösung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EtOAc 2:1) aufgereinigt und der Aldehyd **S03** (435 mg, 1.55 mmol, 48%) als kristalliner, farbloser Feststoff erhalten.

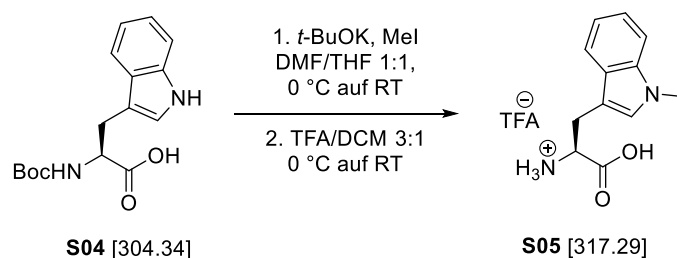
**DC:**  $R_f = 0.32$  (PE/EtOAc 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 3.84$  (m, 2H,  $\alpha$ H), 4.22-4.35 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.31-7.44 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 7.72 (d, 2H,  $^3J = 7.2$  Hz, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 7.90 (d, 2H,  $^3J = 7.4$  Hz, Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 9.46 ppm (s, 1H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 46.6$  (Fmoc-CH), 59.7 ( $\alpha$ CH), 65.7 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1, 125.1, 127.0, 127.6 (jeweils Fmoc-CH<sub>arom.</sub>), 140.7, 143.8 (jeweils Fmoc-C<sub>arom.</sub>), 156.6 (Fmoc-CO), 200.2 (CHO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>]: 304.0944, gef.: 304.0944.

## 6.3.3 H-Tryptophan-(NMe)-OH (S05)



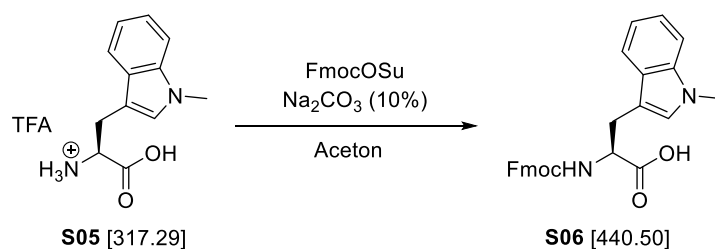
Boc-Trp-OH ( <b>S04</b> ) [304.34]	1.00 eq	986 $\mu\text{mol}$	300 mg
<i>t</i> -BuOK [1 M in THF]	2.03 eq	2.00 mmol	2.00 mL
Methyliodid [141.94; $\rho = 2.27$ ]	1.04 eq	1.03 mmol	64.5 $\mu\text{L}$
TFA/DCM [3:1]			4.00 mL

Eine Lösung von Boc-Trp-OH (**S04**, 300 mg, 986  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in DMF/THF (1:1, 10 mL) wurde unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine 1 M Lösung von *t*-BuOK (2.00 mL, 2.00 mmol, 2.03 eq) in THF bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 10 min gerührt und MeI (64.5  $\mu\text{L}$ , 1.03 mmol, 1.04 eq) über 5 min zugetropft. Nach Rühren der Lösung für 3 h bei RT wurde mit HCl (2 N, 10 mL) verdünnt, dreimal mit EtOAc (10 mL) extrahiert sowie mit Zitronensäure (10%ig, 40 mL) und  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in TFA/DCM 3:1 (4 mL) bei 0 °C gelöst, für 4 h gerührt und mit Toluol und Chloroform coevaporiert. Es wurde das entsprechende TFA-Salz von **S05** (310 mg, 933  $\mu\text{mol}$ , 95%) erhalten, das direkt in der nächsten Synthese eingesetzt wurde.

**DC:**  $R_f = 0.12$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 3.02$  (dd, 1H,  $^2J = 14.5$  Hz,  $^3J = 9.4$  Hz,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 3.15-3.21 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 3.70 (s, 1H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.19-4.23 (m, 1H,  $\alpha\text{H}$ ), 7.14 (s, 1H, 2- $\text{H}_{\text{Indol}}$ ), 7.24-7.73 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Indol}}$ ), 7.88 (d, 3H,  $^3J = 7.6$  Hz, NH), 12.68 (br. s, 1H, COOH).

## 6.3.4 Fmoc-Tryptophan-(NMe)-OH (S06)



H-Trp(NMe)-OH · TFA ( <b>S05</b> ) [317.29]	1.00 eq	903 $\mu\text{mol}$	300 mg
Fmoc-OSu [337.33]	1.20 eq	1.08 $\mu\text{mol}$	365 mg

Eine Lösung von H-Trp(NMe)-OH · TFA (**S05**, 300 mg, 903  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (10%ig, 5 mL) wurde unter Rühren mit einer Lösung aus Fmoc-OSu (365 mg, 1.08 mmol, 1.20 eq) in Aceton (5 mL) versetzt. Die farblose Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) verdünnt und mit Diethylether (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl-Lösung (2 N) angesäuert und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung und Trocknen über  $\text{MgSO}_4$  wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (**S06**, 280 mg, 636  $\mu\text{mol}$ , 70%) erhalten.

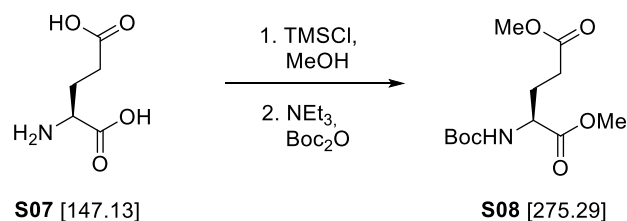
**DC:**  $R_f = 0.26$  (EtOAc).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 3.02$  (dd, 1H,  $^2J = 14.5$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 3.16-3.23 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 3.70 (s, 1H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.17-4.27 (m, 4H,  $\alpha\text{H}$ , Fmoc-CH, Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 7.13 (s, 1H, 2- $\text{H}_{\text{Indol}}$ ), 7.24-7.73 (m, 12H,  $\text{CH}_{\text{Indol}}$ , Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.88 (d, 1H,  $^3J = 7.6$  Hz, NH), 12.7 (br. s, 1H, COOH) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 46.6$  (Fmoc-CH), 59.7 ( $\alpha\text{CH}$ ), 65.7 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 120.1, 125.1, 127.0, 127.6 (jeweils Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 140.7, 143.8 (jeweils Fmoc- $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156.6 (Fmoc-CO), 200.2 (CHO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+]$ : 463.1628, gef.: 463.1629.

## 6.3.5 Boc-Glutaminsäure(OMe)-OMe (S08)



Glutaminsäure ( <b>S07</b> ) [147.13]	1.00 eq	10.0 mmol	1.48 g
TMSCl [108.64; $\rho = 0.85$ ]	4.40 eq	44.0 mmol	5.70 mL
Triethylamin [101.19; $\rho = 0.73$ ]	6.50 eq	65.0 mmol	9.00 mL
Bocanhydrid [218.25]	1.10 eq	11.0 mmol	2.40 g

Eine Lösung von Glutaminsäure (**S07**, 1.48 g, 10.0 mmol, 1.00 eq) in MeOH (20 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde TMSCl (5.70 mL, 44.0 mmol, 4.40 eq) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und für 14 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die farblose Suspension mit Triethylamin (9.00 mL, 65.0 mmol, 6.50 eq) und Bocanhydrid (2.40 g, 11.0 mmol, 1.10 eq) versetzt. Nach Rühren der Lösung für 14 h bei RT wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen, mit HCl (1 N, 200 mL), ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurde die geschützte Glutaminsäure (**S08**, 2.68 g, 9.75 mmol, 98%) erhalten.

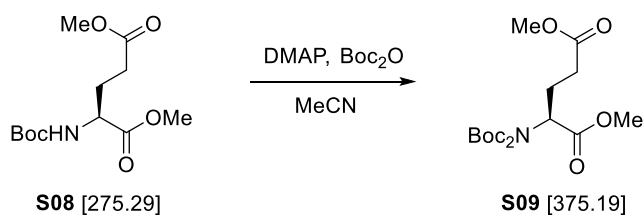
**DC:**  $R_f = 0.82$  (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 1.37$  (s, 9H, *t*Bu), 1.71-1.84 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.89-2.00 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.34-2.40 (m, 2H,  $\gamma$ H), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.95-4.06 (m, 1H,  $\alpha$ H), 7.29 (d, 1H,  $^3J = 7.9$  Hz, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 25.9$  ( $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 26.8 ( $\beta$ CH), 28.1 (Boc-CH<sub>3</sub>), 51.3 (OCH<sub>3</sub>), 51.7 (OMe), 52.6 ( $\alpha$ CH), 78.2 (Boc-C), 155.5 (Boc-CO), 172.6 (2xCO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 298.1261, gef.: 298.1261.



6.3.6 *N,N*-Diboc-Glutaminsäure(OMe)-OMe (S09)

Boc-Glutaminsäure(OMe)-OMe ( <b>S08</b> ) [275.29]	1.00 eq	9.44 mmol	2.60 g
4-Dimethylaminopyridin [122.17]	0.20 eq	1.89 mmol	232 mg
Bocanhydrid [218.25]	1.61 eq	15.1 mmol	3.31 g

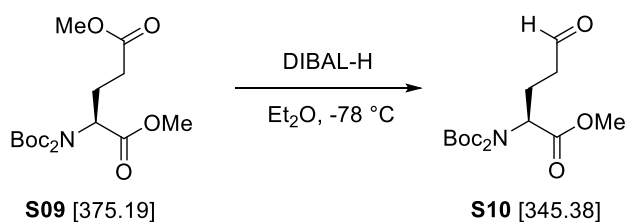
Zu einer Lösung von Boc-Glutaminsäure(OMe)-OMe (**S08**, 2.60 g, 9.44 mmol, 1.00 eq) in MeCN (30 mL) wurden bei RT 4-DMAP (232 mg, 1.89 mmol, 0.20 eq) und Bocanhydrid (3.31 g, 15.1 mmol, 1.61 eq) gegeben. Die Reaktion wurde für 16 h gerührt, mit HCl-Lösung (1 N) verdünnt, dreimal mit EtOAc (100 mL) extrahiert sowie mit Zitronensäure (10%ig, 100 mL) und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Petrolether (1:6) aufgereinigt. Es wurde die vollständig geschützte Glutaminsäure (**S09**, 2.13 g, 5.66 mmol, 60%) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.85$  (EtOAc/PE 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.42 (s, 18H, *t*Bu), 1.97-2.11 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.22-2.36 (m, 3H,  $\gamma$ H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.85 -4.89 (m, 1H,  $\alpha$ H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 24.6 ( $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 27.4 (Boc-CH<sub>3</sub>), 29.8 ( $\beta$ CH), 51.3 (OCH<sub>3</sub>), 52.6 (OMe), 56.9 ( $\alpha$ CH), 82.7 (Boc-C), 151.4 (Boc-CO), 170.2 (CO), 172.4 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>1</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>]: 398.1785, gef.: 398.1785.

6.3.7 *N,N*-Diboc-Glutaminsäure(CHO)-OMe (**S10**)

Diboc-Glutaminsäure(OMe)-OMe ( <b>S09</b> ) [375.19]	1.00 eq	8.10 mmol	3.05 g
DIBAL-H [1 M in Toluol]	1.10 eq	8.94 mmol	9.00 mL

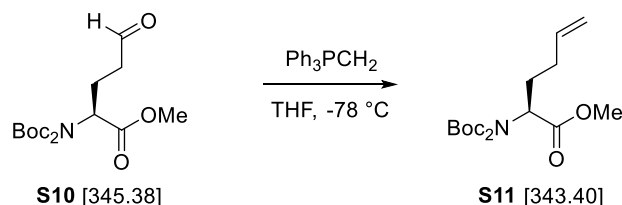
Eine Lösung von Diboc-Glutaminsäure(OMe)-OMe (**S09**, 3.05 g, 8.10 mmol, 1.00 eq) in abs. Et<sub>2</sub>O (30 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre auf -78 °C abgekühlt und mit einer 1 M Lösung von DIBAL-H (9.00 mL, 8.94 mmol, 1.10 eq) in Toluol langsam über 5 min bei -78°C versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für weitere 10 min bei -78 °C gerührt und anschließend mit H<sub>2</sub>O (2 mL) versetzt. Die Suspension wurde langsam auf RT erwärmt, mit HCl (1 N) verdünnt, die organische Phase abgetrennt und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Es wurde der Seitenkettenaldehyd der Glutaminsäure (**S10**, 2.65 g, 7.67 mmol, 95%) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.18$  (Et<sub>2</sub>O/PE 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.42 (s, 18H, *t*Bu), 1.93-2.05 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.22-2.34 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.44-2.56 (m, 2H,  $\gamma$ H), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.83 (dd, 1H,  $^3J = 4.9$  Hz,  $^3J = 9.8$  Hz,  $\alpha$ H), 9.64 (s, 1H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 22.4 ( $\beta$ CH<sub>2</sub>), 27.9 (Boc-CH<sub>3</sub>), 40.4 ( $\gamma$ CH), 52.2 (OCH<sub>3</sub>), 57.3 ( $\alpha$ CH), 83.4 (Boc-C), 151.9 (Boc-CO), 170.7 (CO), 200.9 (CHO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 369.1680, gef.: 369.1676.

6.3.8 *N,N*-Diboc-Homoallylglycin-OMe (S11)

Diboc-Glutaminsäure(CHO)-OMe ( <b>S10</b> ) [345.38]	1.00 eq	4.25 mmol	1.46 g
Ph <sub>3</sub> PCH <sub>3</sub> Br [357.22]	1.20 eq	5.10 mmol	1.81 g
<i>t</i> -BuOK [1 M in THF]	1.20 eq	5.10 mmol	5.10 mL

Eine Lösung von Methyltriphenylphosphoniumbromid (1.81 g, 5.10 mmol, 1.20 eq) in abs. THF (10 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von *t*-BuOK (1 M, 5.10 mL, 5.10 mmol, 1.20 eq) in THF bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 50 min bei 0 °C gerührt und eine Lösung von Diboc-Glutaminsäure(CHO)-OMe (**S10**, 1.46 g, 4.25 mmol, 1.00 eq) in abs. THF (10 mL) bei -78 °C über 15 min zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 2 h bei -78 °C gerührt, langsam auf RT erwärmt, für 1 h bei RT weitergerührt und mit Zitronensäure (10%ig, 100 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL) extrahiert sowie mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Diethylether aufgereinigt. Es wurde Diboc-Homoallylglycin-OMe (**S11**, 1.39 g, 4.05 mmol, 95%) als farbloses Öl erhalten.

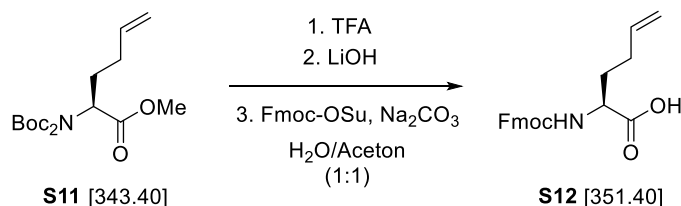
**DC:**  $R_f$  = 0.33 (EtOAc/PE 1:9).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.42 (s, 18H, *t*Bu), 1.81-1.91 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.98-2.14 (m, 3H,  $\gamma$ H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.81 (dd, 1H,  $^3J$  = 4.6 Hz,  $^3J$  = 9.4 Hz,  $\alpha$ H) 4.95-5.04 (m, 2H, Olefin-CH<sub>2</sub>), 5.79 (ddd,  $^3J$  = 6.5 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.4 Hz,  $^3J_{trans}$  = 16.9 Hz, 1H, Olefin-CH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 27.5 (Boc-CH<sub>3</sub>), 28.7 ( $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 29.7 ( $\beta$ CH), 52.0 (OCH<sub>3</sub>), 56.9 ( $\alpha$ CH), 82.5 (Boc-C), 115.5 (Olefin-CH<sub>2</sub>), 137.5 (Olefin-CH), 151.6 (Boc-CO), 170.5 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>1</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 366.1887, gef.: 366.1890.

## 6.3.9 Fmoc-Homoallylglycin (S12)



Diboc-Homoallylglycin-OMe ( <b>S11</b> ) [343.40]	1.00 eq	4.05 mmol	1.39 g
TFA/DCM [1:9]			30.0 mL
LiOH [2 M in H <sub>2</sub> O]	4.94 eq	20.0 mmol	10.0 mL
Fmoc-OSu [337.33]	1.20 eq	4.86 mmol	1.64 g

Eine Lösung von Diboc-Homoallylglycin-OMe (**S11**, 1.39 g, 4.05 mmol, 1.00 eq) in DCM (20 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt und mit TFA/DCM (1:9, 30 mL) versetzt. Die Reaktion wurde langsam über Nacht auf RT erwärmt und nach 16 h unter Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mit einer LiOH-Lösung (2 M, 10 mL) und THF (20 mL) aufgenommen und bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde unter Vakuum auf ca. 20 mL eingeeengt, mit einer HCl-Lösung (2 N) neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in einer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (10%ig, 10 mL) gelöst und unter Rühren mit einer Lösung aus Fmoc-OSu (1.64 g, 4.86 mmol, 1.20 eq) in Aceton (30 mL) versetzt. Die farblose Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt, mit H<sub>2</sub>O verdünnt und mit Diethylether (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl-Lösung (2 N) angesäuert und mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung und Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (**S12**, 1.32 g, 3.76 mmol, 94%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.62-1.84 (m, 2H, βH), 2.02-2.13 (m, 2H, γH), 3.93-3.98 (m, 1H, αH), 4.20-4.31 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.97-5.05 (m, 2H, Olefin-CH<sub>2</sub>), 5.79 (ddd, *J* = 6.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>cis</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> = 16.8 Hz, 1H, Olefin-CH), 7.30-7.91 (m, 9H, NH, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 12.5 (br.s, 1H, COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 29.6 (γCH<sub>2</sub>), 29.9 (βCH), 46.6 (CH-Fmoc), 53.1 (αCH), 65.5 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 115.5 (Olefin-CH<sub>2</sub>), 120.1-127.6 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 137.4 (Olefin-CH), 140.7-143.8 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 156.1 (Fmoc-CO), 173.8 (COOH) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>]: 374.1363, gef.: 374.1361.

6.3.10 2,2-Dimethyl-4-methylmethansulfonat-1,3-dioxolan (**S14**)

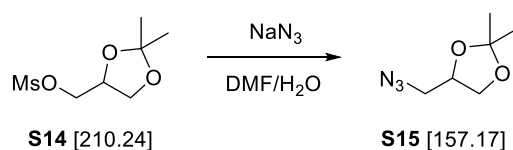
Solketal ( <b>S13</b> ) [132.16]	1.00 eq	75.7 mmol	10.0 g
Triethylamin [101.19; $\rho = 0.73$ ]	1.20 eq	90.8 mmol	12.6 mL
Methansulfonylchlorid [114.55; $\rho = 1.48$ ]	1.15 eq	87.1 mmol	6.74 mL

Zu einer Lösung des Solketals (**S13**, 10.0 g, 75.7 mmol, 1.00 eq) in DCM (25 mL) wurde Triethylamin (9.19 g, 90.8 mmol, 1.20 eq) unter Rühren zugegeben. Zu dieser Lösung wurde MsCl (9.98 g, 87.1 mmol, 1.15 eq) in DCM (15 mL) über 2 h zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 16 h bei RT gerührt. Es wurde dreimal mit wässriger HCl (2 N, 100 mL), ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt. Es wurde das Methansulfonat (**S14**, 14.3 g, 67.8 mmol, 90%) als gelbes, klares Öl erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.10$  (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 1.28$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.73/2.89 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 3.28 (dd,  $^4J = 6.0$  Hz,  $^3J = 13.0$  Hz, 1H, CH<sub>2,diast.</sub>), 3.46 (dd,  $^4J = 3.4$  Hz,  $^3J = 13.0$  Hz, 1H, CH<sub>2,diast.</sub>), 3.66 (dd,  $^4J = 6.0$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH), 3.97-4.02 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>), 4.22-4.28 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 25.2$  (CH<sub>3</sub>), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 36.7 (CH<sub>3</sub>-Sulfon), 65.0 (CH<sub>2</sub>O), 70.0 (Sulfon-CH<sub>2</sub>O), 72.9 (CH), 109.1 (C<sub>quat</sub>) ppm.

6.3.11 2,2-Dimethyl-4-azidomethyl-1,3-dioxolan (**S15**)

Methansulfonat ( <b>S14</b> ) [210.24]	1.00 eq	72.1 mmol	14.0 g
Natriumazid [65.01]	1.20 eq	86.5 mmol	5.62 g

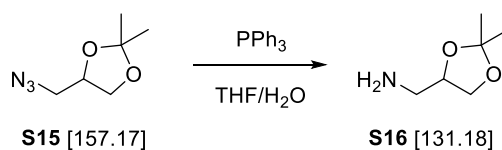
2,2-Dimethyl-4-methylmethansulfonat-1,3-dioxolan (**S14**, 14.0 g, 72.1 mmol, 1.00 eq) wurde in DMF (20 mL) gelöst und mit einer Lösung von Natriumazid (5.62 g, 86.5 mmol, 1.20 eq) in H<sub>2</sub>O (20 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 6 h unter Rückfluss erhitzt, bis mittels DC-Kontrolle das Ende der Reaktion angezeigt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) versetzt und mit Diethylether (5 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt. Es wurde das Azid (**S15**, 8.03 g, 51.1 mmol, 71%) als farbloses Öl erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.80$  (EtOAc/DCM 1:3).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 1.28$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.25-4.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.65 (dd, 1H,  $^4J = 6.0$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 4.00 (dd, 1H,  $^4J = 6.6$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 4.22-4.28 (m, 1H, CH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 25.1$  (CH<sub>3</sub>), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 52.1 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 65.8 (CH<sub>2</sub>O), 74.3 (CH), 108.9 (C<sub>quat</sub>) ppm.

## 6.3.12 2,2-Dimethyl-4-aminomethyl-1,3-dioxolan (S16, Gld)



Azid ( <b>S15</b> ) [157.17]	1.00 eq	51.1 mmol	8.03 g
Triphenylphosphin [262.28]	1.30 eq	66.4 mmol	17.4 g

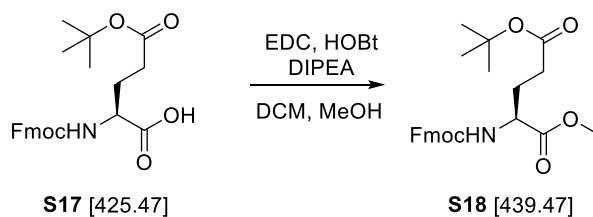
2,2-Dimethyl-4-azidomethyl-1,3-dioxolan (**S15**, 8.03 g, 51.1 mmol, 1.00 eq) wurde in THF/H<sub>2</sub>O 5:1 (60 mL) gelöst und unter Rühren mit Triphenylphosphin (17.4 g, 66.4 mmol, 1.30 eq) versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingeeengt und der Rückstand fraktioniert destilliert. Es wurde das primäre Amin (**S16**, 3.44 g, 26.3 mmol, 51%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

**Siedepunkt:** 60 - 68 °C (22 mbar).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.52-2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.59-3.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.90-3.99 (m, 2H, CH, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 25.4 (CH<sub>3</sub>), 26.8 (CH<sub>3</sub>), 44.3 (CH<sub>2</sub>N), 66.5 (CH<sub>2</sub>O), 77.2 (CH), 107.9 (C<sub>quat</sub>) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup>]: 132.1019, gef.: 132.1019.

6.3.13 Fmoc-Glutaminsäure(*t*Bu)-OMe (S18)

Fmoc-Glutaminsäure( <i>t</i> Bu)-OH ( <b>S17</b> ) [425.47]	1.00 eq	2.35 mmol	1.00 g
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.10 eq	2.58 mmol	349 mg
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	4.70 mmol	0.83 mL
EDC · HCl [191.7]	1.10 eq	2.58 mmol	496 mg
MeOH			2.00 mL

Zu einer Lösung von Fmoc-Glutaminsäure(*t*Bu)-OH (**S17**, 1.00 g, 2.35 mmol, 1.00 eq) in DCM (15 mL) wurde unter Rühren Methanol (2.00 mL) und DIPEA (607 mg, 4.7 mmol, 2.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde auf 0 °C abgekühlt und mit EDC (496 mg, 2.58 mmol, 1.10 eq) und HOBT (349 mg, 2.58 mmol, 1.10 eq) versetzt. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und für 16 h bei RT gerührt, bis mittels DC-Kontrolle das Ende der Reaktion angezeigt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt. Es wurde der entsprechende Methylester (**S18**, 1.00 g, 2.28 mmol, 97%) als farbloses Harz erhalten.

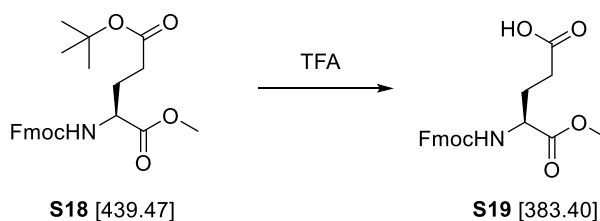
**DC:**  $R_f = 0.72$  (EtOAc/DCM 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.39 (s, 9H, *t*Bu), 1.71-1.84 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.89-2.00 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.25-2.30 (m, 2H,  $\gamma$ H), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.04-4.11 (m, 1H,  $\alpha$ CH), 4.20-4.32 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.31-7.44 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.70-7.72 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.79 (d, 1H,  $^3J = 7.9$  Hz, NH), 7.88-7.91 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 462.1887, gef.: 462.1885.



## 6.3.14 Fmoc-Glutaminsäure-OMe (S19)



Fmoc-Glutaminsäure( <i>t</i> Bu)-OMe ( <b>S18</b> ) [439.47]	1.00 eq	2.28 mmol	1.00 g
TFA [114.02]			10.0 mL

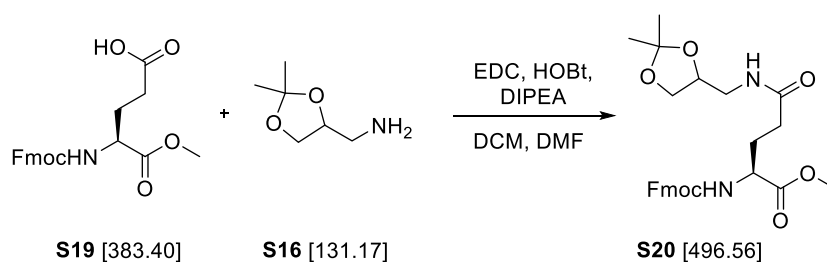
Fmoc-Glutaminsäure(*t*Bu)-OMe (**S18**, 1.00 g, 2.28 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA (10 mL) bei 0 °C gelöst. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und für 1 h bei RT gerührt, bis mittels DC-Kontrolle kein Edukt mehr vorhanden war. TFA wurde am Rotationsverdampfer entfernt und zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde aus Hexan/Diethylether 1:1 umkristallisiert und als farbloser Feststoff (855 mg, 2.23 mmol, 98%) erhalten. Alternativ wurde der Rückstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit HCl-Lösung (2 N) gewaschen, die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. In beiden Syntheserouten wurden quantitative Ausbeuten erreicht.

**DC:**  $R_f = 0.10$  (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.81-2.00 (m, 2H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.24 (t,  $^3J = 7.9$  Hz, 2H,  $\gamma$ H), 3.62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.35- 4.24 (m, 4H,  $\alpha$ H, Fmoc-CH, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 7.36 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.40 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.70 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.79 (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 1H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.84 (d,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H, NH), 7.90 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 12.28 (br. s, 1H, COOH) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 406.1261, gef.: 406.1262.

## 6.3.15 Fmoc-Glutaminsäure(Gld)-OMe (S20)



Fmoc-Glutaminsäure-OMe ( <b>S19</b> ) [383.40]	1.00 eq	1.72 mmol	660 mg
1,3-Dioxolan ( <b>S16</b> ) [131.17]	1.33 eq	2.29 mmol	300 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.33 eq	2.29 mmol	350 mg
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	3.44 mmol	0.59 mL
EDC · HCl [191.7]	1.33 eq	2.29 mmol	439 mg

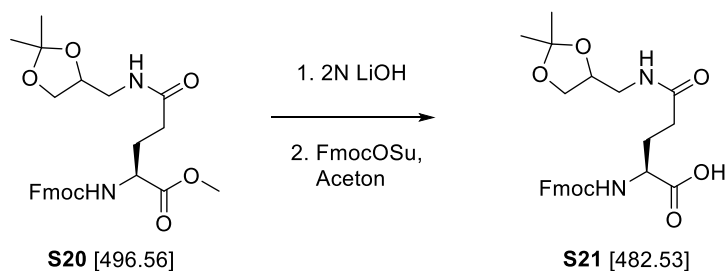
Fmoc-Glutaminsäure-OMe (**S19**, 660 mg, 1.72 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (50 mL) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 2,2-Dimethyl-4-aminomethyl-1,3-dioxolan (Gld, **S16**, 300 mg, 2.29 mmol, 1.33 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde EDC (439 mg, 2.29 mmol, 1.33 eq), HOBT (350 mg, 2.29 mmol, 1.33 eq) und DIPEA (0.59 mL, 3.44 mmol, 2.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und bei RT für 16 h gerührt, bis mittels DC-Kontrolle das Ende der Reaktion angezeigt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Petrolether (5:1) aufgereinigt. Es wurde das entsprechende Amid (**S20**, 514 mg, 1.04 mmol, 60%) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.41$  (EtOAc/PE 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 1.24$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.76-1.83 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.94-2.00 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.17-2.20 (m, 2H,  $\gamma$ H), 3.15-3.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.55-3.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.91-3.94 (m, 2H, CH, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 4.01-4.06 (m, 2H, CH,  $\alpha$ CH), 4.21-4.33 (m, 3H, Fmoc CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.32-7.44 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.71-7.74 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.78 (d, 1H,  $^3J = 8.0$  Hz, NH-Glu), 7.89-7.90 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.95 (t, 1H,  $^3J = 5.9$  Hz, NH-Gld) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 519.2102, gef.: 519.2103.

## 6.3.16 Fmoc-Glutaminsäure(Gld)-OH (S21)



Fmoc-Glutaminsäure(S16)-OMe (S20)	1.00 eq	785 $\mu\text{mol}$	390 mg
LiOH [2 M in H <sub>2</sub> O]	12.7 eq	10.0 mmol	5.00 mL
Fmoc-OSu [337.33]	1.20 eq	942 $\mu\text{mol}$	318 mg

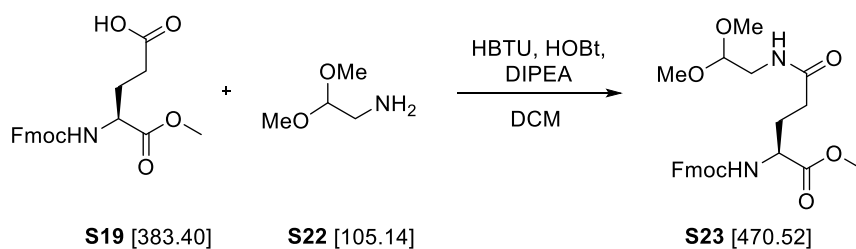
Fmoc-Glutaminsäure(Gld)-OMe (S20, 390 mg, 785  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurde in einer LiOH-Lösung (2 M, 5.00 mL) und THF (10 mL) aufgenommen und bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde mit HCl-Lösung (2 N) neutralisiert und unter Vakuum auf ca. 10 mL eingengt. Dieser Ansatz wurde unter Rühren mit einer Lösung aus Fmoc-OSu (318 mg, 942  $\mu\text{mol}$ , 1.20 eq) in Aceton (5 mL) und 10%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (10 mL) versetzt. Die farblose Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt, mit H<sub>2</sub>O verdünnt und mit Diethylether (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl-Lösung (2 N) angesäuert und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung und Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (S21, 349 mg, 725  $\mu\text{mol}$ , 92%) erhalten.

DC:  $R_f = 0.40$  (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.73-1.84 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 1.93-2.02 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 2.16-2.22 (m, 2H,  $\gamma\text{H}$ ), 3.15 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.56 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.92 (dd,  $^2J = 14.3$  Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.99-4.07 (m, 1H, CH), 4.01-4.06 (m, 1H,  $\alpha\text{CH}$ ), 4.21-4.29 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.33 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.71-7.74 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.73 (d, 1H,  $^3J = 8.0$  Hz, NH-Glu), 7.90 (d,  $^3J = 5.1$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.96 (t, 1H,  $^3J = 5.9$  Hz, NH-Gld), 12.47 (s, 1H, COOH) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 505.1945, gef.: 505.1942.

## 6.3.17 Fmoc-Glutaminsäure(Gla)-OMe (S23)



Fmoc-Glutaminsäure-OMe ( <b>S19</b> ) [383.40]	1.00 eq	5.95 mmol	2.28 g
Aminoacetaldehyddimethylacetal ( <b>S22</b> ) [105.14]	1.50 eq	8.92 mmol	940 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.50 eq	8.92 mmol	1.36 g
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	5.00 eq	29.7 mmol	5.20 mL
HBTU [379.24]	1.50 eq	8.92 mmol	3.40 g

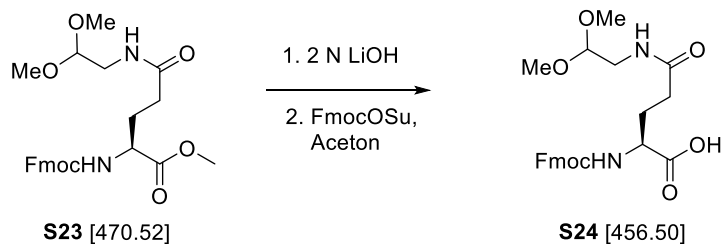
Fmoc-Glutaminsäure-OMe (**S19**, 2.28 g, 5.95 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (100 mL) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit Aminoacetaldehyddimethylacetal (Gla, **S22**, 940 mg, 8.92 mmol, 1.50 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde HBTU (3.40 g, 8.92 mmol, 1.50 eq), HOBT (1.36 g, 8.92 mmol, 1.50 eq) und DIPEA (5.20 mL, 29.7 mmol, 5.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und für 16 h gerührt, bis mittels DC-Kontrolle das Ende der Reaktion angezeigt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure (10%ig), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat aufgereinigt. Es wurde das entsprechende Amid (**S23**, 0.98 g, 2.08 mmol, 35%) erhalten. Mittels IBCF-Kupplungsbedingungen konnte die Ausbeute in späteren Synthesen auf 80% gesteigert werden.

DC:  $R_f = 0.48$  (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.73-1.85 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.90-2.02 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.19 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H,  $\gamma$ H), 3.24 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.00-4.07 (m, 1H,  $\alpha$ CH), 4.20-4.36 (m, 5H, CH<sub>2</sub>N, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.33 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.72 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.80 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, NH-Glu), 7.90 (d,  $^3J = 5.1$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.92 (t, 1H,  $^3J = 5.9$  Hz, NH-Gla) ppm.

HRMS (ESI): ber. für [C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 493.1945, gef.: 493.1946.

## 6.3.18 Fmoc-Glutaminsäure(Gla)-OH (S24)



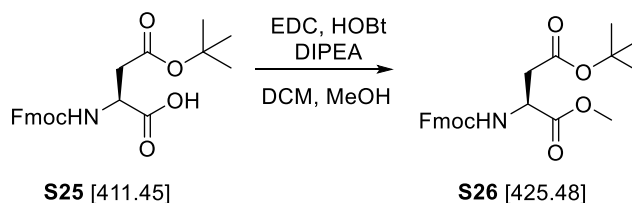
Fmoc-Glutaminsäure(Gla)-OMe ( <b>S23</b> )	1.00 eq	2.04 mmol	0.96 g
LiOH [2 M in H <sub>2</sub> O]	50.8 eq	40.0 mmol	20.0 mL
Fmoc-OSu [337.33]	1.10 eq	2.24 mmol	757 mg

Fmoc-Glutaminsäure(Gla)-OMe (**S23**, 0.96 g, 2.04 mmol, 1.00 eq) wurde in einer 2 M LiOH-Lösung (20.0 mL) und THF (10 mL) aufgenommen und bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde mit 2 N HCl-Lösung neutralisiert und unter Vakuum auf ca. 20 mL eingeeengt. Dieser Ansatz wurde unter Rühren mit einer Lösung aus Fmoc-OSu (757 mg, 2.24 mmol, 1.10 eq) in Aceton (10 mL) und 10%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (10 mL) versetzt. Die farblose Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt, mit H<sub>2</sub>O verdünnt und mit Diethylether (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl-Lösung (2 N) angesäuert und mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung und Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (**S24**, 812 mg, 1.78 mmol, 87%) erhalten.

**DC:**  $R_f$  = 0.32 (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.72-1.87 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 1.94-2.04 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.19 (t,  $^3J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\gamma$ H), 3.15 (t,  $^3J$  = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.25 (s, 6H, OMe), 3.92-4.06 (m, 1H,  $\alpha$ CH), 4.20-4.36 (m, 4H, CH, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.33 (t,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.65 (d,  $^3J$  = 7.9 Hz, 1H, NH-Glu), 7.72 (d,  $^3J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.90-7.92 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>, NH-Gla), 12.45 (br. s, 1H, COOH) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 479.1789, gef.: 479.1788.

6.3.19 Fmoc-Asparaginsäure(*t*Bu)-OMe (S26)

Fmoc-Asparaginsäure( <i>t</i> Bu)-OH ( <b>S25</b> ) [411.45]	1.00 eq	7.29 mmol	3.00 g
HOBt · H <sub>2</sub> O [153.14]	0.10 eq	729 µmol	112 mg
DIPEA [129.25; ρ = 0.73]	1.55 eq	11.2 mmol	2.00 mL
EDC · HCl [191.7]	1.20 eq	8.75 mmol	1.68 g
MeOH			20.0 mL

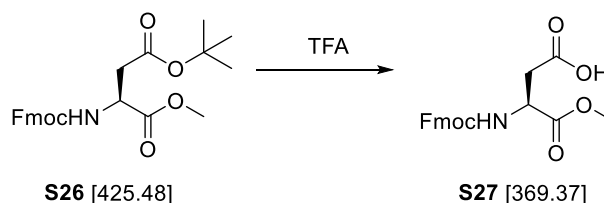
Zu einer Lösung von Fmoc-Asparaginsäure(*t*Bu)-OH (**S25**, 3.00 g, 7.29 mmol, 1.00 eq) in DCM (80 mL) wurde unter Rühren Methanol (20.0 mL) und DIPEA (2.00 mL, 11.2 mmol, 1.55 eq) gegeben. Die Reaktion wurde auf 0 °C abgekühlt und mit EDC (1.68 g, 8.75 mmol, 1.20 eq) und HOBt (112 mg, 729 µmol, 0.10 eq) versetzt. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und für 16 h bei RT gerührt, bis mittels DC-Kontrolle das Ende der Reaktion angezeigt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM (50 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt. Es wurde der entsprechende Methylester (**S26**, 2.11 g, 4.95 mmol, 68%) als farbloses Harz erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 2.51-2.61 (m, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 2.71 (dd, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J = 16.3 Hz, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.20-4.25 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.31-4.34 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.38-4.45 (m, 1H, αCH), 7.34 (t, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.69 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.84 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.89 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K): δ = 27.6 (*t*Bu), 36.8 (βC) 46.6 (αC), 52.1 (CH), 65.5 (CH<sub>3</sub>), 109.7 (CH<sub>2</sub>), 120.0, 121.3, 125.1, 127.0, 127.2, 127.6, 128.9 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 140.7 (CO), 143.7 (CO), 171.4 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 448.1731, gef.: 448.1731.

## 6.3.20 Fmoc-Asparaginsäure-OMe (S27)



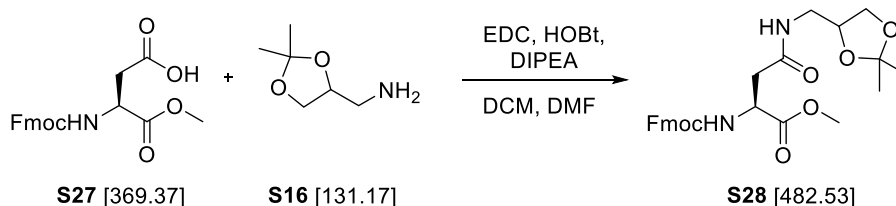
Fmoc-Asparaginsäure( <i>t</i> Bu)-OMe ( <b>S26</b> ) [425.48]	1.00 eq	4.94 mmol	2.10 g
TFA			20.0 mL

Fmoc-Asparaginsäure(*t*Bu)-OMe (**S26**, 2.10 g, 4.94 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA (20 mL) bei 0 °C gelöst. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und für 1 h bei RT gerührt, bis mittels DC-Kontrolle kein Edukt mehr vorhanden war. Entstandener Feststoff wurde abfiltriert und die organische Phase abkondensiert. Der Rückstand wurde mit CHCl<sub>3</sub> (40 mL) und Toluol (50 mL) coevaporiert. Es wurde mit EtOAc (10 mL) verdünnt und mit HCl (0.2 N, 3 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **S27** wurde als farbloser Feststoff (1.49 g, 4.03 mmol, 82%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 2.60 (dd,  $^3J$  = 8.2 Hz,  $^2J$  = 16.4 Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.75 (dd,  $^3J$  = 5.7 Hz,  $^2J$  = 16.6 Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 3.62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.20-4.33 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 4.38-4.45 (m, 1H,  $\alpha$ H), 7.33 (t,  $^3J$  = 7.7 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J$  = 6.9 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.70 (d,  $^3J$  = 7.7 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.84 (d,  $^3J$  = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.89 (d,  $^3J$  = 8.2 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 35.9 ( $\beta$ CH<sub>2</sub>), 46.6 (Fmoc-CH), 50.4 (CH<sub>3</sub>), 52.1 ( $\alpha$ C), 65.7 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1, 125.2, 127.1, 127.6, 140.7, 143.7, 155.8 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 171.4 (CO), 171.6 (CO) ppm.

## 6.3.21 Fmoc-Asparaginsäure(Gld)-OMe (S28)



Fmoc-Asparaginsäure-OMe (S27) [369.37]	1.00 eq	4.00 mmol	1.70 g
1,3-Dioxolan (S16) [131.17]	1.50 eq	6.00 mmol	790 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.50 eq	6.00 mmol	918 mg
DIPEA [129.25; ρ = 0.73]	3.00 eq	12.0 mmol	2.15 mL
EDC · HCl [191.7]	1.50 eq	6.00 mmol	1.15 g

Fmoc-Asparaginsäure-OMe (S27, 1.70 g, 4.00 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM/DMF (100 mL, 1:1) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 2,2-Dimethyl-4-aminomethyl-1,3-dioxolan (Gld, S16, 790 mg, 6.00 mmol, 1.50 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde EDC (1.15 g, 6.00 mmol, 1.50 eq), HOBT (918 mg, 6.00 mmol, 1.50 eq) und DIPEA (2.15 mL, 12.0 mmol, 3.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM (50 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Petrolether (5:1) aufgereinigt. Es wurde das entsprechende Amid (S28, 820 mg, 1.70 mmol, 42%) als farbloses Harz erhalten.

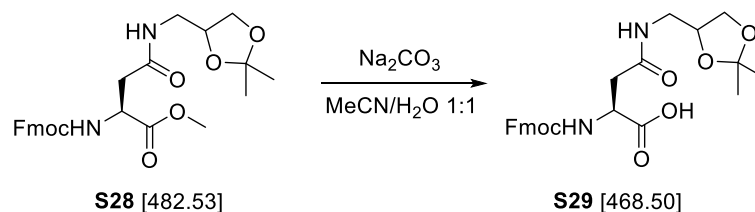
DC:  $R_f$  = 0.46 (EtOAc/PE 5:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (500 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K): δ = 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.52 (m, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 2.62 (dd, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>2</sup>J = 15.2 Hz, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 3.11-3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.56 (d, <sup>3</sup>J = 6.4, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.90-3.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 4.00-4.05 (m, 1H, CH), 4.21-4.24 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.26-4.32 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.42-4.47 (m, 1H, αH), 7.33 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.70 (m, 3H, NH-Asp, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.89 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) 8.04-8.07 (m, 1H, NH-Gld) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR: (125 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K): δ = 25.8 (CH<sub>3</sub>), 27.2 (CH<sub>3</sub>), 37.4 (βC), 41.6 (CH<sub>2</sub>N), 46.8 (CH), 51.0 (αC), 52.5 (OMe), 66.1 (CH<sub>2</sub>), 67.0 (CH<sub>2</sub>O), 74.6 (CH-O), 120.5, 125.2, 127.1, 127.8, 140.6, 144.1 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

HRMS (ESI): ber. für [C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 505.1945, gef.: 505.1954.



6.3.22 Fmoc-Asparaginsäure(Gld)-OH (**S29**)

Fmoc-Asparaginsäure(Gld)-OMe ( <b>S28</b> ) [383.40]	1.00 eq	1.68 mmol	811 mg
wässrige Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung (3%ig) [105.99]			120 mL

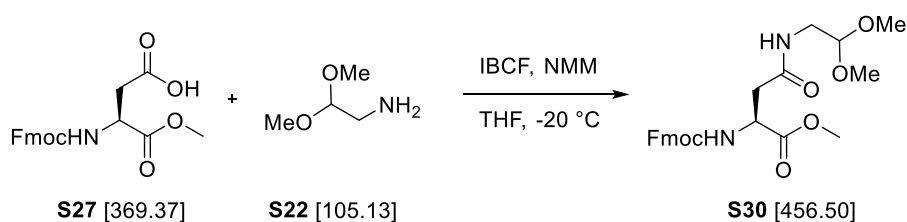
Nach einer modifizierten Vorschrift von ADAMSON et al. wurde das Asparaginsäure-Derivat (**S28**, 811 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) in MeCN (120 mL) gelöst und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%, 120 mL) zugegeben.<sup>[385]</sup> Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Petrolether (3 x 100 mL) extrahiert, mit HCl (0.2 N) angesäuert und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **S29** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 570 mg (1.18 mmol, 70%) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.10$  (EtOAc).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.35-2.52 (m, 2H,  $\beta$ H), 3.11-3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.29-3.44 (m, 2H, CH, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.56-3.62 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O<sub>diast.</sub>), 3.78-3.85 (m, 1H,  $\alpha$ H), 4.00-4.07 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.20-4.25 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 7.33 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.69 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, CH<sub>arom</sub>), 7.86 (d,  $^3J = 7.3$  Hz, NH-Asp), 7.90 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) 8.90-8.96 (m, 1H, NH-Gld) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 491.1789, gef.: 491.1788.

## 6.3.23 Fmoc-Asparaginsäure(Gla)-OMe (S30)



Fmoc-Asparaginsäure-OMe ( <b>S27</b> ) [369.37]	1.00 eq	3.98 mmol	1.47 g
Aminoacetaldehyddimethylacetal ( <b>S22</b> ) [105.13]	1.00 eq	3.98 mmol	418 mg
IBCF [136.58; $\rho = 1.05$ ]	1.00 eq	3.98 mmol	520 $\mu$ L
NMM [129.25; $\rho = 0.73$ ]	1.00 eq	3.98 mmol	0.44 mL

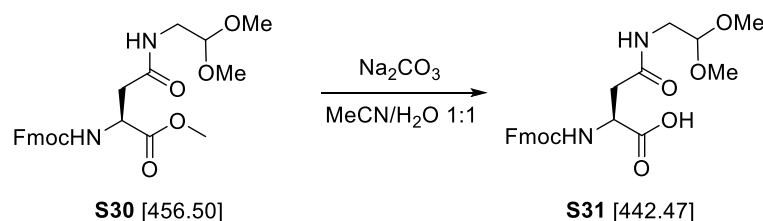
Das Asparaginsäure-Derivat (**S27**, 1.47 g, 3.98 mmol, 1.00 eq) wurde in THF (20 mL) gelöst und auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. *N*-Methylmorpholin (440  $\mu$ L, 3.98 mmol, 1.00 eq), *Isobutylchloroformiat* (520  $\mu$ L, 3.98 mmol, 1.00 eq) und Aminoacetaldehyddimethylacetal (**S22**, 430  $\mu$ L, 3.98 mmol, 1.00 eq) wurden zugetropft, das Reaktionsgemisch 1 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , anschließend 1 h bei RT und 15 min bei  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit HCl (0.2 N, 3 x 50 mL) und halbges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3 x 50 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phase wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/ EtOAc 1:3) aufgereinigt. Das Produkt **S30** konnte als farbloser Feststoff (863 mg, 1.89 mmol, 48%) erhalten werden.

**DC:**  $R_f = 0.30$  (EtOAc/PE 1:3).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 2.54$  (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 2.62 (dd,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^2J = 15.3$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}$ ), 3.15 (q,  $^3J = 5.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.24 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.25 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.23 (q,  $^3J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}-(\text{OCH}_3)_2$ ), 4.31 (m, 3H, Fmoc- $\text{CH}_2$ , Fmoc-CH), 4.44 (q,  $^3J = 7.2$  Hz,  $\alpha\text{CH}$ ), 7.33 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.42 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.66 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, NH, Asp), 7.70 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.89 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) 8.00 (t,  $^3J = 5.9$  Hz, 1H, NH, Gla) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 36.8$  ( $\beta\text{C}$ ), 40.5 ( $\alpha\text{C-Gla}$ ), 46.6 ( $\text{CH}-(\text{OCH}_3)_2$ ), 50.6 ( $\alpha\text{C-Asp}$ ), 53.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.4 (CH), 65.7 ( $\text{CH}_2$ ), 102.0, 120.1, 125.2, 127.0, 127.6, 140.7, 143.7 (Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 155.7 (Fmoc-CO), 169.0 (CO), 172.0 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+]$ : 479.1789, gef.: 479.1777.

6.3.24 Fmoc-Asparaginsäure(Gla)-OH (**S31**)

Fmoc-Asparaginsäure(Gla)-OMe ( <b>S30</b> ) [465.50]	1.00 eq	1.89 mmol	863 mg
wässrige Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung (3%ig) [105.99]			135 mL

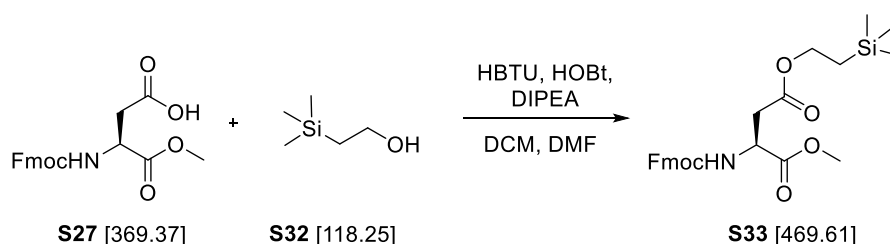
Nach einer modifizierten Vorschrift von ADAMSON et al. wurde das Asparaginsäure-Derivat (**S30**, 863 mg, 1.89 mmol, 1.00 eq) in MeCN (135 mL) gelöst und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%, 135 mL) zugegeben.<sup>[385]</sup> Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Petrolether (3 x 100 mL) extrahiert, mit HCl (0.2 N) angesäuert und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **S31** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 566 mg (1.28 mmol, 68%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 2.51(m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 2.61 (dd,  $^3J$  = 6.3 Hz,  $^2J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>), 3.15 (q,  $^3J$  = 5.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.25 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.23 (q,  $^3J$  = 7.3 Hz, 1H, CH-(OMe)<sub>2</sub>), 4.29 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH,  $\alpha$ H), 7.33 (t,  $^3J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J$  = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.50 (d,  $^3J$  = 8.45 Hz, 1H, NH-Asp), 7.71 (d,  $^3J$  = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.89 (d,  $^3J$  = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) 7.96 (t,  $^3J$  = 5.8 Hz, 1H, NH-Gla), 12.56 (s, 1H, COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 36.8 ( $\beta$ C), 40.6 ( $\alpha$ C-Gla), 46.6 (CH-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 50.6 ( $\alpha$ C-Asp), 53.3 (OCH<sub>3</sub>), 62.3 (CH), 65.7 (CH<sub>2</sub>), 102.1, 120.1, 127.0, 127.6, 140.7, 143.8 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 155.8 (Fmoc-CO), 169.3 (CO), 173.0 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>]: 465.1643, gef.: 465.1619.

## 6.3.25 Fmoc-Asparaginsäure(TMSE)-OMe (S33)

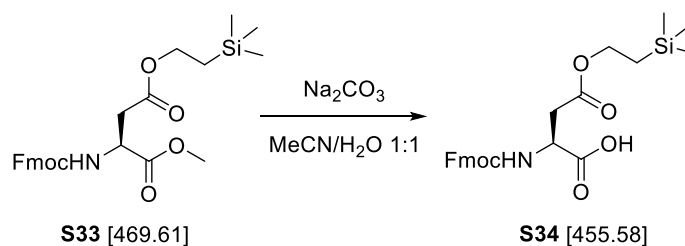


Fmoc-Asparaginsäure-OMe ( <b>S33</b> ) [369.37]	1.00 eq	7.00 mmol	2.58 g
TMS-Ethanol ( <b>S32</b> ) [118.25; $\rho = 0.83$ ]	1.20 eq	8.38 mmol	1.20 mL
HOBt · H <sub>2</sub> O [153.14]	0.10 eq	0.70 mmol	110 mg
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	1.55 eq	10.8 mmol	1.92 mL
HBTU [379.24]	1.20 eq	8.38 mmol	3.18 g

Das Asparaginsäure-Derivat (**S27**, 2.58 g, 7.00 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (100 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde HOBt (110 mg, 0.70 mmol, 0.10 eq), DIPEA (1.92 mL, 10.8 mmol, 1.55 eq), HBTU (3.18 g, 8.38 mmol, 1.20 eq) und 2-(Trimethylsilyl)ethanol (**S32**, 1.20 mL, 8.38 mmol, 1.20 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in EtOAc (50 mL) aufgenommen, mit HCl (0.2 N, 3 x 50 mL) und verdünnter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Petrolether/EtOAc (1:4) aufgereinigt. Der doppelte Ester **S33** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 2.04 g (4.35 mmol, 63%) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.80$  (EtOAc/PE 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 0.00 (s, 9H, TMS), 0.93 (t,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H, Si-CH<sub>2</sub>), 2.66 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^2J = 16.5$  Hz, 1H,  $\beta H_{\text{diast}}$ ), 2.79 (dd,  $^3J = 6.2$  Hz,  $^2J = 16.2$  Hz, 1H,  $\beta H_{\text{diast}}$ ), 4.08-4.14 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.19-4.24 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.30-4.33 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.41-4.48 (m, 1H,  $\alpha H$ ), 7.32 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.69 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.75 (d,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H, NH), 7.90 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

6.3.26 Fmoc-Asparaginsäure(TMSE)-OH (**S34**)

Fmoc-Asparaginsäure(TMSE)-OMe (**S33**) [469.61] 1.00 eq      4.35 mmol      2.04 g  
 wässrige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%ig) [105.99]      300 mL

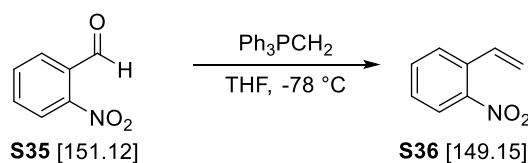
Nach einer modifizierten Vorschrift von ADAMSON et al. wurde das Asparaginsäure-Derivat (**S33**, 2.04 g, 4.35 mmol, 1.00 eq) in MeCN (300 mL) gelöst und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (3%ig, 300 mL) zugegeben.<sup>[385]</sup> Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend wurde die wässrige Phase mit Petrolether (3 x 100 mL) gewaschen. Es wurde mit HCl (0.2 N) angesäuert, mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **S34** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 1.92 g (4.21 mmol, 97%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 0.00 (s, 9H, TMS), 0.93 (t, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, Si-CH<sub>2</sub>), 2.63 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>2</sup>J = 16.0 Hz, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 2.78 (dd, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, <sup>2</sup>J = 16.3 Hz, 1H, βH<sub>diast.</sub>), 4.11 (dd, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, <sup>2</sup>J = 9.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.19-4.30 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 4.33-4.41 (m, 1H, αH), 7.32 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.42 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.69 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 7.74 (d, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>arom</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = -1.5 (TMS), 16.7 (Si-CH<sub>2</sub>), 36.1 (βC), 46.6 (αC), 50.4 (CH), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 65.7 (CH<sub>2</sub>), 120.1, 125.2, 127.0, 127.6, 140.7, 143.7 (Fmoc-CH<sub>arom</sub>), 155.8 (Fmoc-CO), 170.1 (CO), 172.4 (CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 478.1656, gef.: 478.1651.

## 6.3.27 2-Nitrostyrol (S36)



2-Nitrobenzaldehyd ( <b>S35</b> ) [151.12]	1.00 eq	6.61 mmol	1.00 g
Ph <sub>3</sub> PCH <sub>3</sub> Br [357.22]	1.50 eq	10.0 mmol	3.57 g
KHMDS [0.5 M in Toluol]	1.50 eq	10.0 mmol	20.0 mL

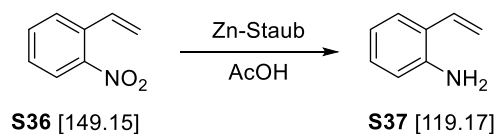
Eine Lösung von Methyltriphenylphosphoniumbromid (3.57 g, 10.0 mmol, 1.50 eq) in abs. THF (30 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von KHMDS (0.5 M, 20.0 mL, 10.0 mmol, 1.50 eq) in Toluol bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 50 min bei 0 °C gerührt und eine Lösung von 2-Nitrobenzaldehyd (**S35**, 1.00 g, 6.61 mmol, 1.00 eq) in abs. THF (20 mL) bei -78 °C über 15 min zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 2 h bei -78 °C gerührt, langsam auf RT erwärmt für 14 h weitergerührt und anschließend mit Zitronensäure (10%ig, 50 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL) extrahiert sowie mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Filtration im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (8:1) aufgereinigt. Es wurde 2-Nitrostyrol (**S36**, 400 mg, 2.67 mmol, 40%) als brauner Feststoff erhalten.

**DC:**  $R_f$  = 0.83 (EtOAc/PE 1:8).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 5.51 (dd,  $^3J$  = 11.0 Hz,  $^2J$  = 1.0 Hz, 1H, Olefin-CH<sub>cis</sub>), 5.91 (dd,  $^3J$  = 17.1 Hz,  $^2J$  = 1.0 Hz, 1H, Olefin-CH<sub>trans</sub>), 7.00 (dd,  $^3J$  = 17.3 Hz,  $^2J$  = 11.0 Hz, 1H, Olefin-CH), 7.55 (ddt,  $^3J$  = 8.2 Hz,  $^3J$  = 7.3 Hz,  $^4J$  = 1.5 Hz, 1H, 4-H), 7.72 (ddt,  $^3J$  = 7.9 Hz,  $^3J$  = 1.6 Hz,  $^4J$  = 0.6 Hz, 1H, 5-H), 7.80 (tdd,  $^3J$  = 7.9 Hz,  $^3J$  = 1.6 Hz,  $^4J$  = 0.6 Hz, 1H, 6-H), 7.96 (ddd,  $^3J$  = 8.2 Hz,  $^4J$  = 1.3 Hz,  $^5J$  = 0.4 Hz, 1H, 3-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 119.5 (Olefin-CH<sub>2</sub>), 124.1 (3-C), 128.1 (1-C), 129.0 (6-C), 131.5 (4-C), 131.8 (Olefin-CH), 133.4 (5-C), 147.7 (2-C) ppm.

## 6.3.28 2-Aminostyrol (S37)



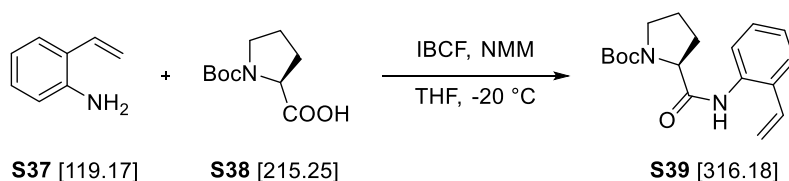
2-Nitrostyrol ( <b>S36</b> ) [149.15]	1.00 eq	2.68 mmol	400 mg
Zinkstaub [65.38]	6.30 eq	16.9 mmol	1.11 g

Zu einer Lösung von 2-Nitrostyrol (**S36**, 400 mg, 2.68 mmol, 1.00 eq) in Eisessig (10 mL) wurde Zinkstaub (1.11 g, 16.9 mmol, 6.30 eq) in kleinen Portionen zugegeben. Die exotherme Reaktion wurde mit einem Eisbad abgekühlt und die Suspension für 3 d bei RT gerührt. Der verbliebene Feststoff wurde abfiltriert und die saure Produktlösung mit wässriger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung vorsichtig neutralisiert. Das Produkt wurde anschließend mit Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Amin am Hochvakuum getrocknet. Es wurde 2-Aminostyrol (**S37**, 320 mg, 2.67 mmol, 99%) als bräunliches Öl erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 5.13 (dd,  $^3J$  = 11.0 Hz,  $^2J$  = 1.6 Hz, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{cis}}$ ), 5.56 (dd,  $^3J$  = 17.4 Hz,  $^2J$  = 1.6 Hz, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{trans}}$ ), 6.52 (ddt,  $^3J$  = 7.7 Hz,  $^3J$  = 7.2 Hz,  $^4J$  = 0.6 Hz, 1H, 4-H), 6.62 (ddd,  $^3J$  = 8.1 Hz,  $^3J$  = 1.3 Hz,  $^4J$  = 0.4 Hz, 1H, 3-H), 6.88 (dd,  $^3J$  = 16.8 Hz,  $^2J$  = 10.5 Hz, 1H, Olefin-CH), 6.95 (ddt,  $^3J$  = 7.1 Hz,  $^3J$  = 1.6 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz, 1H, 5-H), 7.26 (dd,  $^3J$  = 7.7 Hz,  $^4J$  = 1.7 Hz, 1H, 6-H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 112.6 (Olefin- $\text{CH}_2$ ), 115.5 (3-C), 116.2 (5-C), 121.4 (1-C), 125.6 (4-C), 128.5 (6-C), 132.8 (Olefin-CH), 145.8 (2-C) ppm.

## 6.3.29 Boc-Prolin-2-Aminostyrol (S39)



2-Aminostyrol ( <b>S37</b> ) [119.17]	1.00 eq	3.25 mmol	387 mg
Boc-Prolin-OH ( <b>S38</b> ) [215.25]	1.00 eq	3.25 mmol	0.70 g
IBCF [136.58; $\rho = 1.05$ ]	1.00 eq	3.25 mmol	423 $\mu\text{L}$
NMM [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	6.5 mmol	714 $\mu\text{L}$

Boc-Prolin-OH (**S38**, 0.70 g, 3.25 mmol, 1.00 eq) wurde in THF (20 mL) gelöst und auf  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt. *N*-Methylmorpholin (357  $\mu\text{L}$ , 3.25 mmol, 1.0 eq) und *Isobutylchloroformiat* (423  $\mu\text{L}$ , 3.25 mmol, 1.00 eq) wurden zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt, 2-Aminostyrol (**S37**, 387 mg, 3.25 mmol, 1.00 eq) zugegeben und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h gerührt. Anschließend wurde 1 h bei RT und 15 min bei  $45\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit HCl (0.2 N, 3 x 50 mL) und halbges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3 x 50 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phase wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc 2:1) aufgereinigt. Das Amid **S39** konnte als hellgelbes Öl (806 mg, 2.55 mmol, 69%) erhalten werden.

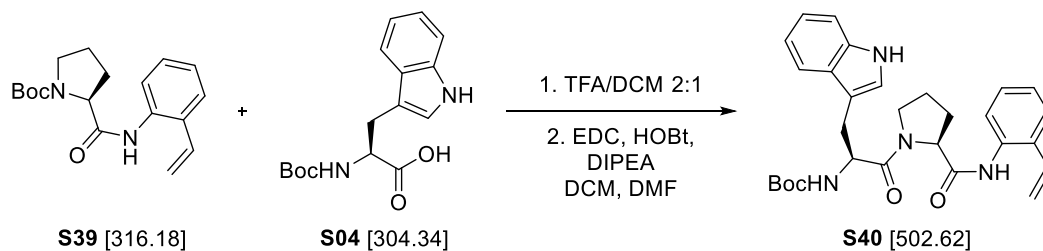
DC:  $R_f = 0.58$  (EtOAc/PE 1:3).

**$^1\text{H-NMR}$** : (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.37/1.42$  (s, 9H,  $t\text{Bu}_{\text{trans/cis}}$ ), 1.77-1.96 (m, 3H,  $\beta\text{H}_{\text{diast}}$ ,  $\gamma\text{H}$ ), 2.10-2.30 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast}}$ ), 3.29-3.46 (m, 2H,  $\delta\text{H}$ ), 4.30 (dd,  $^3J = 8.5\text{ Hz}$ ,  $^3J = 3.5\text{ Hz}$ , 1H,  $\alpha\text{H}$ ), 5.24-5.30 (m, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{cis}}$ ), 5.74-5.81 (m, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{trans}}$ ), 6.83-6.94 (m, 1H, Olefin-CH), 7.17-7.34 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 7.62-7.65 (m, 1H, 3-H), 9.51/9.58 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{trans/cis}}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$** : (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 23.2$  ( $\gamma\text{C}$ ), 28.0 ( $t\text{Bu}$ ), 31.2 ( $\beta\text{C}$ ), 46.6 ( $\delta\text{C}$ ), 59.8 ( $\alpha\text{C}$ ), 78.5 ( $t\text{Bu}_{\text{quat}}$ ), 115.2 (Olefin- $\text{CH}_2$ ), 125.2 (3-C), 125.7 (5-C), 126.2 (4-C), 128.0 (6-C), 131.9 (1-C), 132.4 (Olefin-CH), 134.9 (2-C), 153.5 (Boc-CO), 171.6 (Amid-CO) ppm.

**HRMS (ESI)**: ber. für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}^+]$ : 339.1679, gef.: 339.1675.



6.3.30 Boc-Trp-Pro-2-Aminostyrol (**S40**)

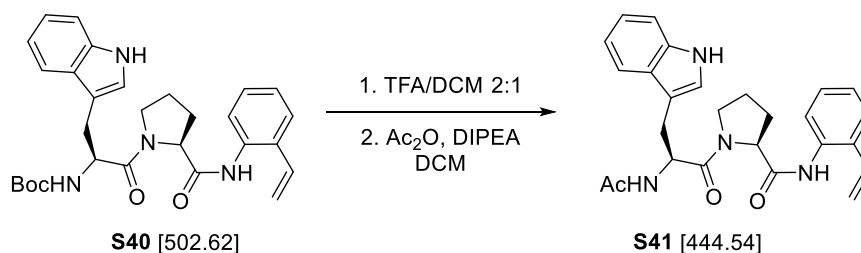
Boc-Prolin-2-Aminostyrol ( <b>S39</b> ) [316.18]	1.00 eq	1.10 mmol	350 mg
TFA [114.02]			4.00 mL
Boc-Tryptophan-OH ( <b>S04</b> ) [304.34]	1.10 eq	1.22 mmol	370 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.10 eq	1.22 mmol	186 mg
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	4.00 eq	4.40 mmol	790 $\mu$ L
EDC · HCl [191.7]	1.10 eq	1.22 mmol	233 mg

Boc-Prolin-2-Aminostyrol (**S39**, 350 mg, 1.10 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA/DCM (6.00 mL, 2:1) gelöst, auf 45 °C erwärmt und das Lösungsmittel nach 1 h unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol coevaporiert, in DCM/DMF (20 mL, 1:1) gelöst und mit Boc-Tryptophan-OH (**S04**, 370 mg, 1.22 mmol, 1.10 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde EDC (233 mg, 1.22 mmol, 1.10 eq), HOBT (186 mg, 1.22 mmol, 1.10 eq) und DIPEA (790  $\mu$ L, 4.40 mmol, 4.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL), H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Petrolether (1:1) aufgereinigt. Es wurde das entsprechende Amid (**S40**, 550 mg, 1.09 mmol, 99%) als farbloses Harz erhalten.

DC:  $R_f = 0.45$  (EtOAc/PE 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.31 (s, 9H, *t*Bu), 1.95-2.06 (m, 3H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Pro,  $\gamma$ H), 2.12-2.22 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Pro), 2.91 (dd,  $^3J = 9.2$  Hz,  $^2J = 14.7$  Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Trp), 3.12 (dd,  $^3J = 4.0$  Hz,  $^2J = 14.9$  Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Trp), 3.59-3.73 (m, 2H,  $\delta$ H-Pro), 4.38-4.46 (m, 1H,  $\alpha$ H-Trp), 4.53-4.57 (m, 1H,  $\alpha$ H-Pro), 5.31 (dd,  $^3J = 11.1$  Hz,  $^2J = 1.2$  Hz, 1H, Olefin-CH<sub>cis</sub>), 5.80 (dd,  $^3J = 17.5$  Hz,  $^2J = 1.3$  Hz, 1H, Olefin-CH<sub>trans</sub>), 6.57 (s, 1H, 2-H-Trp), 6.89-7.08 (m, 4H, Olefin-CH, NH-Trp, 4-H-Ant, 5-H-Ant), 7.19-7.38 (m, 4H, 5-H-Trp, 6-H-Trp, 7-H-Trp, 3-H-Ant), 7.55-7.66 (m, 2H, 4-H-Trp, 6-H-Ant), 9.55 (s, 1H, NH-Ant), 10.83 (s, 1H, NH-Indol) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>]: 525.2472, gef.: 525.2473.

6.3.31 Ac-Trp-Pro-2-Aminostyrol (**S41**)

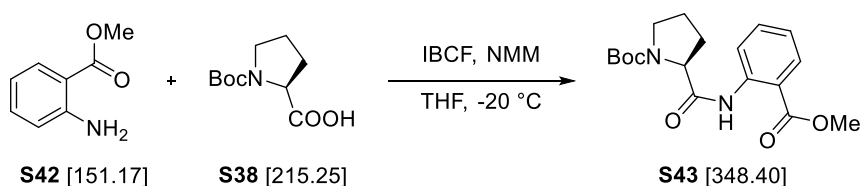
Boc-Trp-Pro-2-Aminostyrol ( <b>S40</b> ) [502.62]	1.00 eq	1.00 mmol	500 mg
TFA [114.02]			4.00 mL
Essigsäureanhydrid [102.09; $\rho = 1.08$ ]	2.00 eq	2.00 mmol	190 $\mu\text{L}$
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	4.00 eq	4.00 mmol	704 $\mu\text{L}$

Boc-Trp-Pro-2-Aminostyrol (**S40**, 500 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA/DCM (6.00 mL, 2:1) gelöst, auf 45 °C erwärmt und das Lösungsmittel nach 1 h unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol coevaporiert, in DCM (10 mL) gelöst und mit DIPEA (704  $\mu\text{L}$ , 4.00 mmol, 4.00 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde Essigsäureanhydrid (190  $\mu\text{L}$ , 2.00 mmol, 2.00 eq) und katalytische Mengen an DMAP gegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 16 h gerührt, das Reaktionsgemisch in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 50 mL) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch mit Ethylacetat aufgereinigt. Es wurde das entsprechende Amid (**S41**, 260 mg, 585  $\mu\text{mol}$ , 59%) als farbloses Öl erhalten.

DC:  $R_f = 0.21$  (EtOAc).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.77$  (s, 3H, Ac), 1.93-2.02 (m, 3H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\gamma\text{H}$ ), 2.11-2.22 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 2.91 (dd,  $^3J = 9.0$  Hz,  $^2J = 14.7$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.16 (dd,  $^3J = 4.7$  Hz,  $^2J = 14.7$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.52-3.59 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.67-3.74 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 4.52 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H,  $\alpha\text{H-Pro}$ ), 4.70-4.79 (m, 1H,  $\alpha\text{H-Trp}$ ), 5.30 (dd,  $^3J = 11.1$  Hz,  $^2J = 1.1$  Hz, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{cis}}$ ), 5.80 (dd,  $^3J = 17.5$  Hz,  $^2J = 1.1$  Hz, 1H, Olefin- $\text{CH}_{\text{trans}}$ ), 6.89-7.07 (m, 3H, Olefin-CH, 4-H-Ant, 5-H-Ant), 7.20-7.37 (m, 5H, 5-H-Trp, 6-H-Trp, 7-H-Trp, 3-H-Ant, 2-H-Trp), 7.58 (d,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, NH-Trp), 7.65 (dd,  $^3J = 7.6$  Hz,  $^4J = 1.4$  Hz, 1H, 6-H-Ant), 8.29 (d,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, 4-H-Trp), 9.54 (s, 1H, NH-Ant), 10.82 (s, 1H, NH-Indol) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}^+]$ : 467.2054, gef.: 467.2054.

6.3.32 Boc-Prolin-Anthranilsäuremethylester (**S43**)

Anthranilsäuremethylester ( <b>S42</b> ) [119.17]	1.00 eq	2.45 mmol	370 mg
Boc-Prolin-OH ( <b>S38</b> ) [215.25]	1.00 eq	2.45 mmol	527 mg
IBCF [136.58; $\rho = 1.05$ ]	1.00 eq	2.45 mmol	318 $\mu\text{L}$
NMM [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	4.90 mmol	538 $\mu\text{L}$

Boc-Prolin-OH (**S38**, 527 mg, 2.45 mmol, 1.00 eq) wurde in THF (10 mL) gelöst und auf -20 °C abgekühlt. *N*-Methylmorpholin (538  $\mu\text{L}$ , 4.90 mmol, 2.00 eq) und *Isobutylchlorformiat* (318  $\mu\text{L}$ , 2.45 mmol, 1.00 eq) wurden zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei -20 °C gerührt, 2-Aminobenzoessäuremethylester (**S42**, 370 mg, 2.45 mmol, 1.00 eq) in THF (10 mL) zugegeben und anschließend 1 h bei RT und 15 min bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit HCl (0.2 N, 3 x mL) und ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (3 x 50 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phase wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc 4:1) aufgereinigt. Das Amid **S43** konnte als farbloses Öl (480 mg, 1.38 mmol, 56%) erhalten werden.

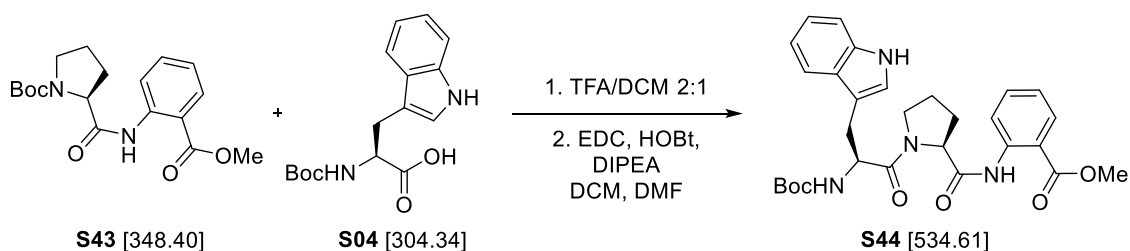
**DC:**  $R_f = 0.80$  (EtOAc/PE 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 1.24/1.42$  (s, 9H, *t*Bu<sub>trans/cis</sub>), 1.83-2.01 (m, 3H,  $\beta$ H<sub>diast</sub>,  $\gamma$ H), 2.16-2.35 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast</sub>), 3.38-3.55 (m, 2H,  $\delta$ H), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.16-4.23 (m, 1H,  $\alpha$ H), 7.19 (ddt,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H, 5-H), 7.63 (ddt,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H, 4-H), 7.97 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, 3-H), 8.45 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, 6-H<sub>trans</sub>), 8.53 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, 6-H<sub>cis</sub>), 11.00/11.23 (s, 1H, NH<sub>trans/cis</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 23.3$  ( $\gamma$ C), 27.8/28.0 (*t*Bu), 30.8 ( $\beta$ C), 46.6 ( $\delta$ C), 52.5 (OMe), 61.9 ( $\alpha$ C), 79.0 (*t*Bu<sub>quat</sub>), 116.7 (1-C), 120.1 (3-C), 123.1 (5-C), 130.7 (6-C), 134.4 (4-C), 139.5 (2-C), 167.5 (Boc-CO), 171.7 (Amid-CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup>]: 371.1577, gef.: 371.1593.

## 6.3.33 Boc-Trp-Pro-Anthranilsäuremethylester (S44)



Boc-Pro-Anthranilsäure-OMe ( <b>S43</b> ) [316.18]	1.00 eq	1.35 mmol	470 mg
TFA [114.02]			6.00 mL
Boc-Tryptophan-OH ( <b>S04</b> ) [304.34]	1.00 eq	1.35 mmol	411 mg
HOAt [136.11]	1.00 eq	1.35 mmol	184 mg
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	3.00 eq	4.05 mmol	717 $\mu\text{L}$
EDC · HCl [191.7]	1.00 eq	1.35 mmol	260 mg

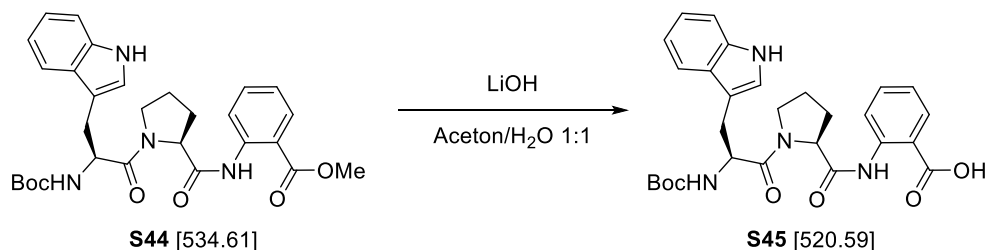
Boc-Pro-Anthranilsäuremethylester (**S43**, 470 mg, 1.35 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA/DCM (9.00 mL, 2:1) gelöst, auf 45 °C erwärmt und das Lösungsmittel nach 1 h unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol coevaporiert, in DCM/DMF (20 mL, 1:1) gelöst und mit Boc-Tryptophan-OH (**S04**, 411 mg, 1.35 mmol, 1.00 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde EDC (260 mg, 1.35 mmol, 1.00 eq), HOAt (184 mg, 1.35 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (717  $\mu\text{L}$ , 3.00 mmol, 3.00 eq) gegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 100 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels das entsprechende Amid (**S44**, 725 mg, 1.35 mmol, 99%) als farbloses Harz erhalten.

DC:  $R_f = 0.31$  (EtOAc/PE 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$** : (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.29$  (s, 9H,  $t\text{Bu}$ ), 1.96-2.06 (m, 3H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\gamma\text{H}$ ), 2.19-2.23 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 2.88 (dd,  $^3J = 10.5$  Hz,  $^2J = 10.3$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.19 (dd,  $^3J = 3.5$  Hz,  $^2J = 14.5$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.79-3.86 (m, 2H,  $\delta\text{H-Pro}$ ), 4.44-4.52 (m, 2H,  $\alpha\text{H-Trp}$ ,  $\alpha\text{H-Pro}$ ), 6.96-7.11 (m, 3H, 4-H-Ant, 5-H-Ant, 5-H-Trp), 7.17-7.23 (m, 2H, 6-H-Trp, 2-H-Trp), 7.33 (d,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, 7-H-Trp), 7.62-7.68 (m, 2H, 3-H-Ant, NH-Trp), 7.96 (dd,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^4J = 1.5$  Hz, 1H, 4-H-Trp), 8.47 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, 6-H-Ant), 10.80 (s, 1H, NH-Indol), 11.07 (s, 1H, NH-Ant) ppm.

**HRMS (ESI)**: ber. für  $[\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}^+]$ : 557.2371, gef.: 557.2391.

## 6.3.34 Boc-Trp-Pro-Anthranilsäure (S45)



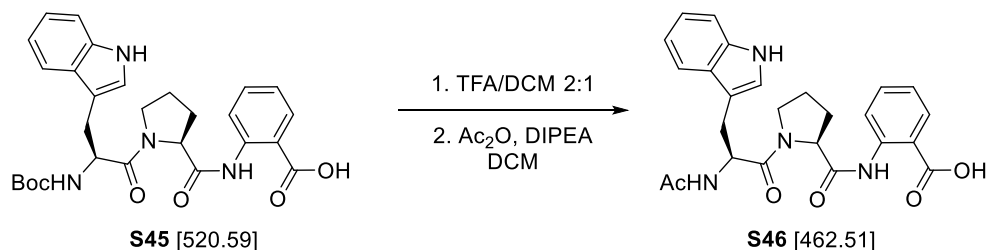
Boc-Trp-Pro-Anthranilsäure-OMe ( <b>S44</b> ) [534.61]	1.00 eq	3.23 mmol	1.73 g
Lithiumhydroxid [23.95]	5.00 eq	16.2 mmol	0.68 g

Boc-Trp-Pro-Anthranilsäuremethylester (**S44**, 1.73 g, 3.23 mmol, 1.00 eq) wurde in einer LiOH-Lösung (2 N, 10.0 mL) und Aceton (10 mL) aufgenommen und bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde mit HCl-Lösung (2 N) neutralisiert und unter Vakuum auf ca. 10 mL eingengt. Das wässrige Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat (3 X 50 mL) extrahiert, die vereinigten organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nach Entfernen des Lösungsmittels die entsprechende Carbonsäure (**S45**, 1.68 g, 3.22 mmol, 99%) als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.28 (s, 9H, *t*Bu), 1.95-2.11 (m, 3H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Pro,  $\gamma$ H), 2.21-2.30 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Pro), 2.85-2.93 (m, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Trp), 3.19 (dd, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, <sup>2</sup>J = 15.3 Hz, 1H,  $\beta$ H<sub>diast.</sub>-Trp), 3.78-3.90 (m, 2H,  $\delta$ H-Pro), 4.38-4.42 (m, 1H,  $\alpha$ H-Pro), 4.53 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, <sup>2</sup>J = 3.4 Hz,  $\alpha$ H-Trp), 6.98 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, NH-Trp), 6.99 (m, 1H, 5-H-Trp), 7.06 (t, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, 6-H-Trp), 7.17 (dt, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz, 1H, 4-H-Ant), 7.19 (s, 1H, 2-H-Trp), 7.33 (d, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H, 7-H-Trp), 7.58 (d, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 1H, 4-H-Trp), 7.62 (dt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, 1H, 5-H-Ant), 8.00 (dd, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 1H, 3-H-Ant), 8.58 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, 1H, 6-H-Ant), 10.80 (s, 1H, NH-Ant), 10.92 (s, 1H, NH-Indol), ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 27.8 (*t*Bu), 24.4 ( $\gamma$ Pro), 26.1 ( $\beta$ -Trp), 29.8 ( $\beta$ -Pro), 46.8 ( $\delta$ -Pro), 52.7 ( $\alpha$ -Trp), 61.9 ( $\alpha$ -Pro), 77.9 (*t*Bu<sub>quat.</sub>), 111.1 (7-C-Trp), 118.1 (4-C-Trp), 118.2 (5-C-Trp), 119.4 (6-C-Ant), 120.6 (6-C-Trp), 122.6 (4-C-Ant), 123.8 (2-C-Trp), 131.0 (3-C-Ant), 134.1 (5-C-Ant), 155.4 (Boc-CO), 169.7-171.9 (Amid-CO) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für [C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>]: 543.2214, gef.: 543.2217.

6.3.35 Ac-Trp-Pro-Anthranilsäuremethylester (**S46**)

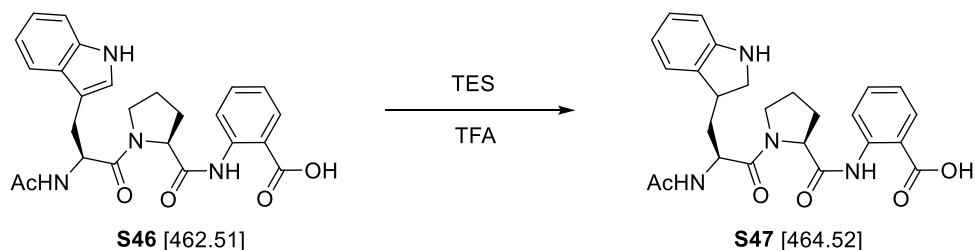
Boc-Trp-Pro-Anthranilsäure ( <b>S45</b> ) [520.59]	1.00 eq	3.22 mmol	1.62 g
TFA [114.02]			20.0 mL
Essigsäureanhydrid [102.09; $\rho = 1.08$ ]	2.00 eq	6.44 mmol	700 $\mu\text{L}$
DIPEA [129.25; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	6.44 mmol	1.30 mL

Boc-Trp-Pro-Anthranilsäure (**S45**, 1.62 g, 3.22 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA/DCM (30.0 mL, 2:1) gelöst, auf 45 °C erwärmt und das Lösungsmittel nach 1 h unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol coevaporiert, in DCM (100 mL) gelöst und mit DIPEA (1.30 mL, 6.44 mmol, 2.00 eq) versetzt. Zu dieser Lösung wurde Essigsäureanhydrid (700  $\mu\text{L}$ , 6.44 mmol, 2.00 eq) und katalytische Mengen an DMAP gegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 16 h gerührt, das Reaktionsgemisch in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit wässriger Zitronensäure-Lösung (10%ig, 50 mL) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und nach Entfernen des Lösungsmittels das entsprechende Amid (**S46**, 1.68 g, 3.21 mmol, 99%) erhalten.

**HPLC:**  $t_R = 10.93$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min, Reinheit 95%).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.78$  (s, 3H, Ac), 1.96-2.12 (m, 3H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\gamma\text{H}$ ), 2.21-2.30 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 2.87-2.91 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.21 (dd,  $^3J = 3.5$  Hz,  $^2J = 15.8$  Hz, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.78-3.91 (m, 2H,  $\delta\text{H-Pro}$ ), 4.40-4.45 (m, 1H,  $\alpha\text{H-Pro}$ ), 4.54 (ddd, 1H,  $^3J = 10.4$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz,  $^2J = 3.4$  Hz,  $\alpha\text{H-Trp}$ ), 7.01 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, NH-Trp), 6.99 (m, 1H, 5-H-Trp), 7.06 (t,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, 6-H-Trp), 7.19 (dt,  $^3J = 7.7$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H, 4-H-Ant), 7.19 (s, 1H, 2-H-Trp), 7.33 (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 1H, 7-H-Trp), 7.58 (d,  $^3J = 7.7$  Hz, 1H, 4-H-Trp), 7.62 (dt,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^4J = 1.5$  Hz, 1H, 5-H-Ant), 8.00 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, 3-H-Ant), 8.58 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, 6-H-Ant), 10.70 (s, 1H, NH-Ant), 10.95 (s, 1H, NH-Indol) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{H}^+]$ : 463.1981, gef.: 463.1982.

6.3.36 Ac-Trp(Indolin)-Pro-Anthranilsäure (**S47**)

Ac-Trp-Pro-Anthranilsäure ( <b>S46</b> ) [462.51]	1.00 eq	216 $\mu\text{mol}$	100 mg
Triethylsilan [116.28; $\rho = 0.73$ ]	2.00 eq	432 $\mu\text{mol}$	69.2 $\mu\text{L}$
TFA [114.02]			5.00 mL

Ac-Trp-Pro-Anthranilsäure (**S46**, 100 mg, 216  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurde in TFA (6.00 mL) gelöst und Triethylsilan (70  $\mu\text{L}$ , 432  $\mu\text{mol}$ , 2.00 eq) unter Rühren zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 19 h bei RT gerührt und das Ende der Reaktion mittels HPLC-Kontrolle bestimmt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand anhand von präparativer HPLC aufgereinigt. Beide entstehenden Diastereomere konnten voneinander getrennt und isoliert werden. Es wurden Diastereomer I (39.2 mg, 84.4  $\mu\text{mol}$ , 39%) und Diastereomer II (18.7 mg, 40.3  $\mu\text{mol}$ , 19 %) als farblose Feststoffe erhalten. Mittels NMR-Spektroskopie konnte nicht eindeutig zwischen den beiden Diastereomeren unterschieden werden.

Analytik des Diastereomers I:

**HPLC:**  $t_R = 13.04$  min (10% - 40% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min, Reinheit 98%).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.69\text{--}1.76$  (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 1.88 (s, 3H, Ac), 1.92–1.98 (m, 3H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\gamma\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 2.16–2.24 (m, 2H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.33–3.38 (m, 2H,  $\gamma\text{H-Trp}$ ,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 3.54–3.59 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.65–3.69 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.71–3.77 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 4.36 (dd,  $^3J = 9.0$  Hz,  $^3J = 3.9$  Hz, 1H,  $\alpha\text{H-Pro}$ ), 4.86 (ddd,  $^3J = 8.8$  Hz,  $^3J = 8.9$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha\text{H-Trp}$ ), 7.08 (br. s, 2H, NH-Indolin), 7.15 (dt,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H, 5-H-Ant), 7.22 (t,  $^3J = 7.7$  Hz, 1H, 7-H-Trp), 7.32 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, 8-H-Trp), 7.57 (dt,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, 4-H-Ant), 7.98 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $^4J = 1.6$  Hz, 6-H-Ant), 8.40 (d,  $^3J = 8.6$  Hz, 1H, NH-Trp), 8.47 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 0.8$  Hz, 1H, 3-H-Ant), 11.45 (s, 1H, NH-Ant) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5\text{H}^+]$ : 465.2132, gef.: 465.2134.

Analytik des Diastereomers II:

**HPLC:**  $t_R = 13.57$  min (10% - 40% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min, Reinheit 96%).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.77$ -1.83 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.94-2.05 (m, 4H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\gamma\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 2.19-2.25 (m, 1H,  $\beta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.31-3.37 (m, 1H,  $\gamma\text{H-Trp}$ ), 3.42-3.45 (m, 1H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.69-3.77 (m, 2H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Pro}$ ), 3.71-3.77 (m, 2H,  $\delta\text{H}_{\text{diast.}}\text{-Trp}$ ), 4.37 (dd,  $^3J = 9.3$  Hz,  $^3J = 3.8$  Hz, 1H,  $\alpha\text{H-Pro}$ ), 4.77 (ddd,  $^3J = 10.5$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H,  $\alpha\text{H-Trp}$ ), 7.07 (br. s, 2H, NH-Indolin), 7.13 (dt,  $^3J = 7.7$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H, 5-H-Ant), 7.20 (t,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, 7-H-Trp), 7.26 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, 8-H-Trp), 7.55 (dt,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, 4-H-Ant), 7.95 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz, 1H,  $^4J = 1.6$  Hz, 6-H-Ant), 8.37 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, NH-Trp), 8.46 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 0.9$  Hz, 1H, 3-H-Ant), 11.53 (s, 1H, NH-Ant) ppm.

**HRMS (ESI):** ber. für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5\text{H}^+]$ : 465.2132, gef.: 465.2138.



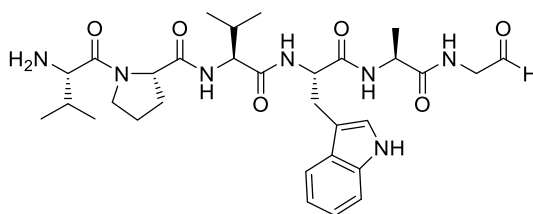
## **6.4 Festphasensynthese der Peptide**

Die aufgeführten Molmassen der dargestellten Peptide beziehen sich auf die Reinpeptide ohne die entsprechenden Trifluoracetat-Gegenionen. Aufgrund des hohen Anteils an nicht bekannten Salzen, die bei der Abspaltung entstehen und der spontanen Abspaltung von Peptidfragmenten vom Harz durch die Reaktionsbedingungen während der Entschützungs- und Kupplungsreaktionen, wurde auf die Angabe von Ausbeuten verzichtet.

Soweit möglich wurde für sämtliche Peptide eine tabellarische Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR Verschiebungen durchgeführt. Aufgrund der Größe der Peptide, der Signalüberlappung und dem Fehlen von Signalen sind einige Peptide nicht vollständig charakterisierbar. In diesen Fällen wurden die Peptide nach chromatographischer Aufreinigung nur über HPLC, Massenspektroskopie und anhand von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren analysiert. Sämtliche Peptide wurden anhand von semi-präparativer oder präparativer HPLC aufgereinigt und wiesen laut HPLC-Chromatogramm eine Reinheit von  $>90\%$  auf.

Cyclische Peptide wurden im Rahmen der IUPAC-Nomenklatur benannt. Imin- und Amino-peptide wurden separat angegeben.

## 6.4.1 Synthese von Peptid 1



H-VPVWAG-H

C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> [611.74]

Der Peptidaldehyd **1** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem TentaGel-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptidaldehyds erfolgte anschließend über 30 min mit AcOH/H<sub>2</sub>O/DCM/MeOH (10:5:63:22) bei RT. Vorher wurde mit trockener TFA die Seitenkettenschutzgruppe des Tryptophans abgespalten. Aufgrund der C-terminalen Aldehydfunktion liegt bei der NMR-spektroskopischen Analyse ein Gemisch aus Aldehyd, Hydrat und einem Indol-NH-Aldehyd Addukt vor. Das Hemiaminal **1a** wurde ebenfalls tabellarisch zugeordnet.

**HPLC:**  $t_R = 11.54$  min (15% - 65% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min, Reinheit 95%).

**HR-MS (ESI):** für C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>H<sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>], ber.: 612.3504, gef.: 612.3508.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

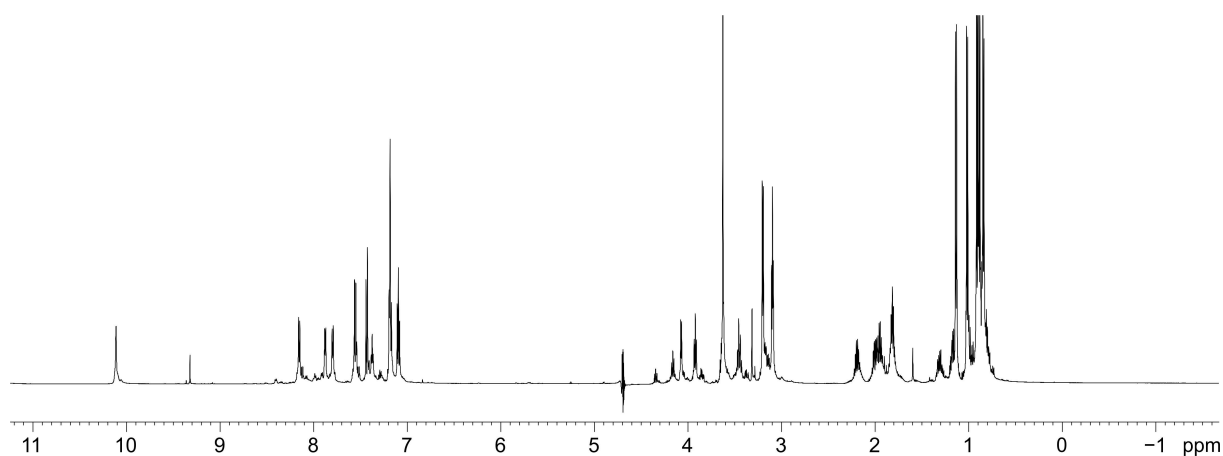
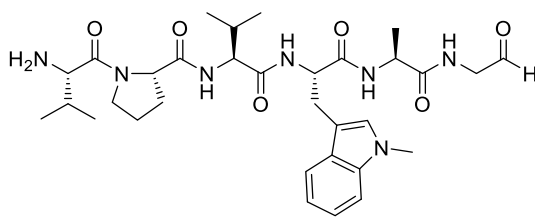


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **1** (oben) sowie Peptid **1a** (unten) aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Val<sup>1</sup></b>	*	4.17	2.29	Hγ	1.01, 1.11
<b>Pro<sup>2</sup></b>	-	4.44	1.42, 2.10	Hγ	1.92
				Hδ	3.55, 3.74
<b>Val<sup>3</sup></b>	8.26	4.02	2.06	Hγ	0.94, 0.98
<b>Trp<sup>4</sup></b>	7.98	4.71	3.30	2-H	7.28
				4-H	7.66
				5-H	7.19
				6-H	7.29
				7-H	7.53
				NH	10.11
<b>Ala<sup>5</sup></b>	7.90	4.26	1.23	-	
<b>Gly<sup>6</sup></b>	7.47	3.19	-	CHO	9.42
				CH(OH) <sub>2</sub>	5.00
				CH(OH) <sub>2</sub>	*
Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Val<sup>1</sup></b>	*	4.18	2.36	Hγ	1.05, 1.15
<b>Pro<sup>2</sup></b>	-	4.44	1.42, 2.10	Hγ	1.92
				Hδ	3.55, 3.74
<b>Val<sup>3</sup></b>	8.26	4.02	2.06	Hγ	0.94, 0.98
<b>Trp<sup>4</sup></b>	8.60	4.43	3.01, 3.36	2-H	6.93
				4-H	7.86
				5-H	7.28
				6-H	7.34
				7-H	7.97
<b>Ala<sup>5</sup></b>	7.90	4.26	1.25	-	
<b>Gly<sup>6</sup></b>	7.58	3.21	-	CHO	9.43
				CH(OH) <sub>2</sub>	5.00
				CH(OH) <sub>2</sub>	*

## 6.4.2 Synthese von Peptid 2



H-VPVW(NMe)AG-H

 $C_{32}H_{47}N_7O_6$  [625.77]

Der am Indol *N*-methylierte Peptidaldehyd **2** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem TentaGel-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptidaldehyds erfolgte anschließend über 30 min mit AcOH/H<sub>2</sub>O/DCM/MeOH (10:5:63:22) bei RT. Aufgrund der C-terminalen Aldehydfunktion liegt bei der NMR-spektroskopischen Analyse ein Gemisch aus Aldehyd und Hydrat vor.

**HPLC:**  $t_R = 13.09$  min (15% - 65% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min, Reinheit 95%).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{33}H_{51}N_7O_7H^+$  [ $M + MeOH + H^+$ ], ber.: 658.3923, gef.: 658.3918.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

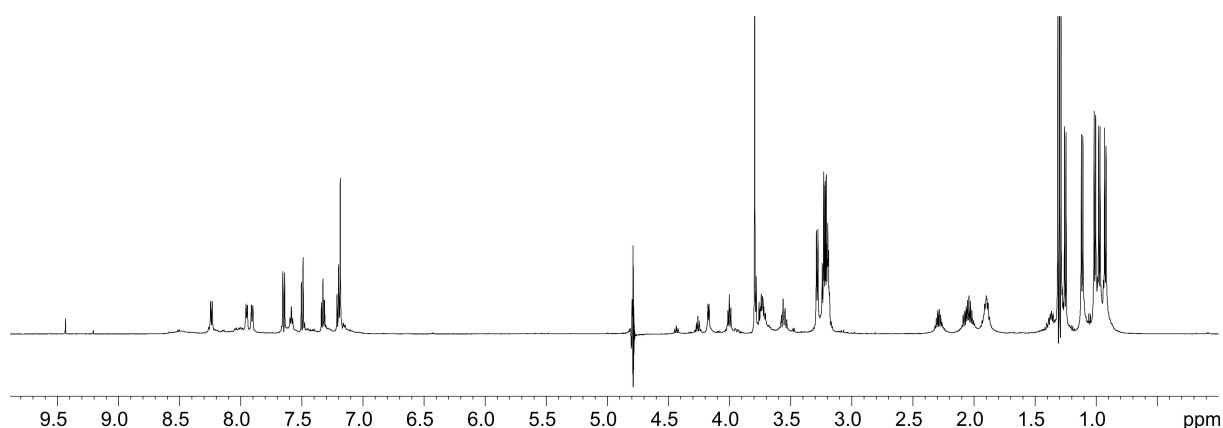
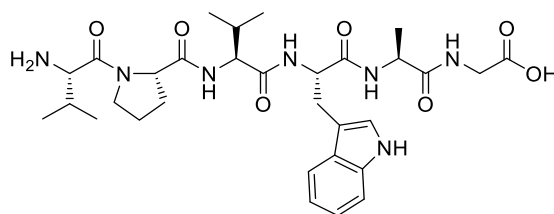


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **2** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Val</b> <sup>1</sup>	*	4.17	2.29	Hγ	1.01, 1.12
<b>Pro</b> <sup>2</sup>	-	4.43	1.37, 2.05	Hγ	1.90
				Hδ	3.56, 3.74
<b>Val</b> <sup>3</sup>	8.24	4.00	2.04	Hγ	0.92, 0.97
<b>Trp</b> <sup>4</sup>	7.95	4.59	3.28	2-H	7.19
				4-H	7.65
				5-H	7.20
				6-H	7.33
				7-H	7.50
				NMe	3.79
<b>Ala</b> <sup>5</sup>	7.90	4.26	1.25	-	
<b>Gly</b> <sup>6</sup>	7.58	3.21	-	CHO	9.43
				CH(OH) <sub>2</sub>	5.00
				CH(OH) <sub>2</sub>	*

### 6.4.3 Synthese von Peptid 3



H-VPVWAG-OH

$C_{31}H_{45}N_7O_7$  [627.74]

Das Peptid **3** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Zur Abspaltung vom Harz wurde wässrige TFA (95%ig) verwendet.

**HPLC:**  $t_R = 12.6$  min (10% - 70% MeCN in 30 min, 0.42 mL/min, Reinheit 95%).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{31}H_{45}N_7O_7Na^+$  [ $M+Na^+$ ], ber.: 650.3273, gef.: 650.3258.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

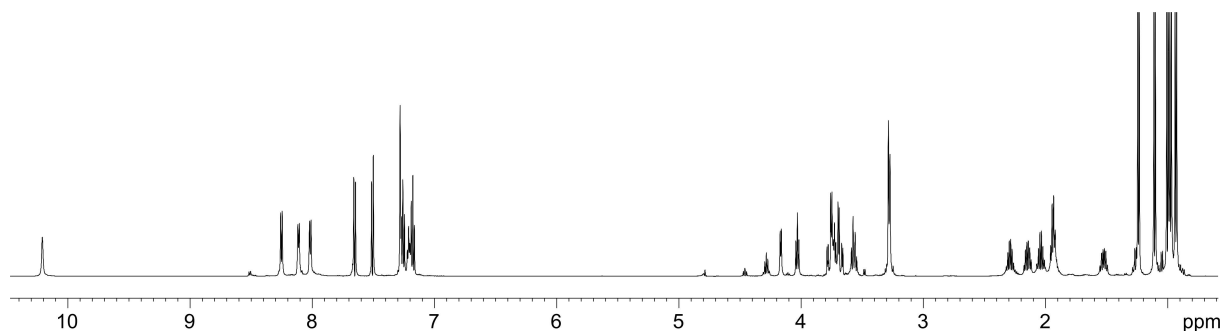
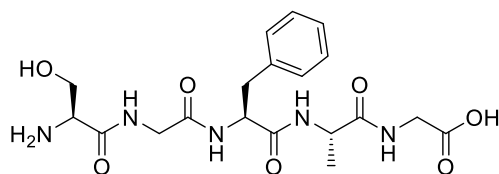


Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **3** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Val</b> <sup>1</sup>	*	4.08	2.22	H $\gamma$	0.92, 1.02
<b>Pro</b> <sup>2</sup>	-	4.38	1.43, 2.06	H $\gamma$ H $\delta$	1.78, 1.88 3.48, 3.71
<b>Val</b> <sup>3</sup>	8.16	3.97	1.96	H $\gamma$	0.85, 0.89
<b>Trp</b> <sup>4</sup>	8.00	4.61	3.17, 3.23	2-H 4-H 5-H 6-H 7-H NH	7.20 7.56 7.10 7.17 7.42 10.12
<b>Ala</b> <sup>5</sup>	7.92	4.21	1.16	-	
<b>Gly</b> <sup>6</sup>	7.11	3.61	-	-	

## 6.4.4 Synthese von Peptid 4



H-SGFAG-OH

 $C_{19}H_{27}N_5O_7$  [437.45]

Das Peptid **4** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch wässrige TFA (95%ig). Zur weiteren Analyse wurde das Peptid mit 2.00 eq Natriumperiodat umgesetzt und ein N-terminaler Peptidaldehyd erhalten. Die tabellarische Zuordnung erfolgte für das Serin-Peptid.

**HR-MS (ESI):** für  $C_{19}H_{27}N_5O_7H^+$  [ $M+H^+$ ], ber.: 438.1983, gef.: 438.1981.

**HR-MS (ESI):** für  $C_{19}H_{26}N_4O_8Na^+$  [ $M(CHO)+MeOH + Na^+$ ], ber.: 461.1643, gef.: 461.1641.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/ $D_2O$  5:1.

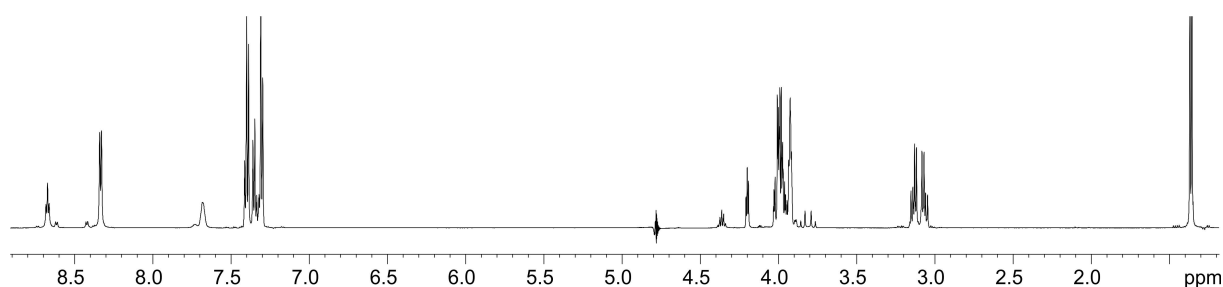




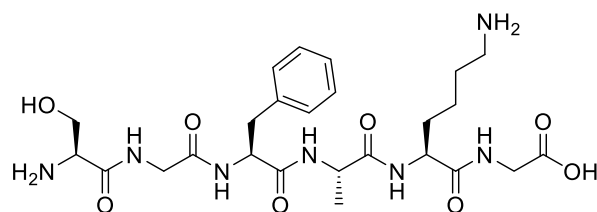
Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **4** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere
<b>Ser</b> <sup>1</sup>	*	3.84	3.75	-
<b>Gly</b> <sup>2</sup>	7.51	3.73, 3.82	-	-
<b>Phe</b> <sup>3</sup>	8.16	4.19	2.89, 2.96	H <sub>arom.</sub> 7.12 – 7.24
<b>Ala</b> <sup>4</sup>	8.17	4.03	1.19	-
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	8.50	3.67, 3.85	-	-

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ )/ppm) von Peptid **4** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>Ser</b> <sup>1</sup>	54.4	60.7	-	
<b>Gly</b> <sup>2</sup>	40.8	-	-	
<b>Phe</b> <sup>3</sup>	54.2	38.0	4-C	126.6
			2/3/5/6-C	128.2-129.8
<b>Ala</b> <sup>4</sup>	48.3	18.7	-	
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	42.0	-	-	

## 6.4.5 Synthese von Peptid 5



H-SGFAKG-OH

 $C_{25}H_{39}N_7O_8$  [565.63]

Das Peptid **5** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Zur Abspaltung vom Harz wurde wässrige TFA (95%ig) verwendet. Zur weiteren Analyse wurde das Peptid mit 2.00 eq Natriumperodat umgesetzt und ein N-terminaler Peptidaldehyd erhalten. Die tabellarische Zuordnung erfolgt für das Serin-Peptid.

**HR-MS (ESI):** für  $C_{25}H_{39}N_7O_8H^+$   $[M+H^+]$ , ber.: 566.2933, gef.: 566.2938.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

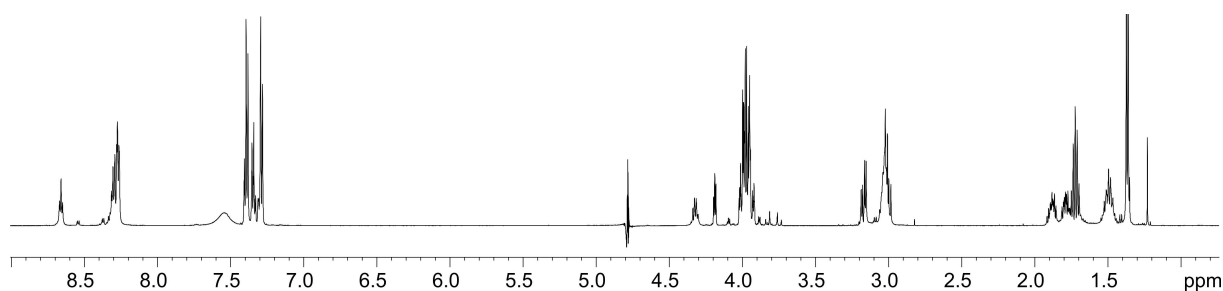


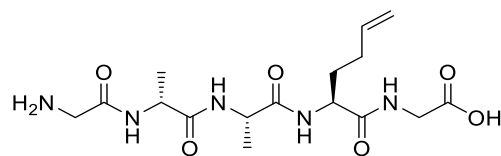
Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **5** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Ser</b> <sup>1</sup>	*	3.81	3.78	-	
<b>Gly</b> <sup>2</sup>	8.10	3.77, 3.82	-	-	
<b>Phe</b> <sup>3</sup>	8.12	4.15	2.83, 2.99	2-6-H 7.12 – 7.24	
<b>Ala</b> <sup>4</sup>	8.14	4.02	1.19	-	
<b>Lys</b> <sup>5</sup>	8.09	4.01	1.62, 1.71	H $\gamma$	1.32
				H $\delta$	1.55
				H $\epsilon$	2.86
				NH <sub>3</sub>	7.38
<b>Gly</b> <sup>6</sup>	8.49	3.75, 3.84	-	-	

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ )/ppm) von Peptid **5** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>Ser</b> <sup>1</sup>	55.0	60.9	-	
<b>Gly</b> <sup>2</sup>	41.1	-	-	
<b>Phe</b> <sup>3</sup>	54.1	37.8	4-C	126.6
			2,3,5,6-C	128.1-129.8
<b>Ala</b> <sup>4</sup>	48.8	18.3	-	
<b>Lys</b> <sup>5</sup>	52.2	26.8	C $\gamma$	22.3
			C $\delta$	31.9
			C $\epsilon$	39.2
<b>Gly</b> <sup>6</sup>	42.1	-	-	

### 6.4.6 Synthese von Peptid 6



H-GaAXG-OH (X = Hag)

$C_{16}H_{27}N_5O_6$  [385.42]

Das Peptid **6** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 und 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min. Alternativ erfolgte die Abspaltung mit HFIP/DCM 4:1 für 30 min bei RT.

**HPLC:**  $t_R = 4.76$  min (15% - 65% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min, Reinheit 96%).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{16}H_{27}N_5O_6H^+$   $[M+H^+]$ , ber.: 386.2034, gef.: 386.2031.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

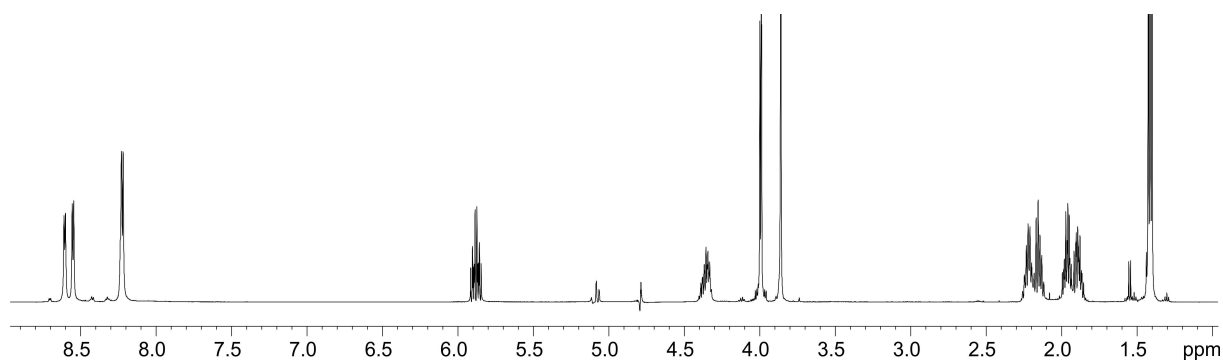


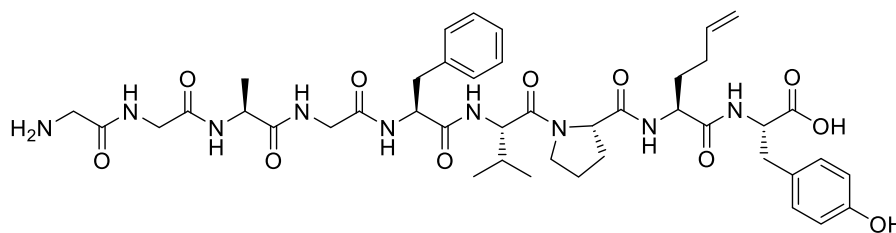
Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **6** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Gly</b> <sup>1</sup>	*	3.69	-	-	
<b>ala</b> <sup>2</sup>	8.43	4.21	1.25	-	
<b>Ala</b> <sup>3</sup>	8.38	4.19	1.23	-	
<b>Hag</b> <sup>4</sup>	8.05	4.16	1.72, 1.79	H $\gamma$	2.15, 2.21
				CH	5.88
				CH <sub>2</sub>	5.09
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	8.06	3.82	-	-	

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ )/ppm) von Peptid **6** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>Gly</b> <sup>1</sup>	40.6	-	-	
<b>ala</b> <sup>2</sup>	48.6	18.8	-	
<b>Ala</b> <sup>3</sup>	48.5	18.8	-	
<b>Hag</b> <sup>4</sup>	52.2	31.7	C $\gamma$	29.6
			CH	138.3
			CH <sub>2</sub>	115.5
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	41.1	-	-	

## 6.4.7 Synthese von Peptid 7



H-GGAGFVPXY-OH (X = Hag)

 $C_{43}H_{59}N_9O_{11}$  [878.00]

Das Peptid **7** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 und 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min. Alternativ erfolgte die Abspaltung mit HFIP/DCM 4:1 für 30 min bei RT.

**HPLC:**  $t_R = 20.34$  min (10% - 40% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min, Reinheit 90%).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{43}H_{59}N_9O_{11}Na^+$   $[M+Na^+]$ , ber.: 900.4226, gef.: 900.4223.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

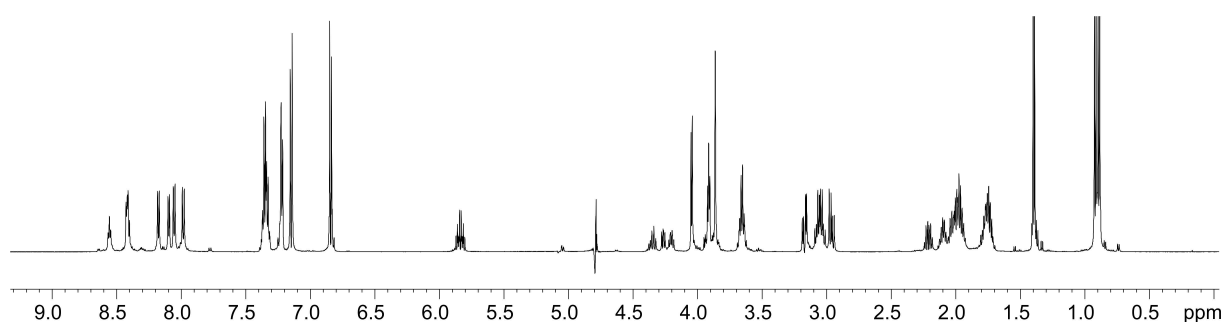
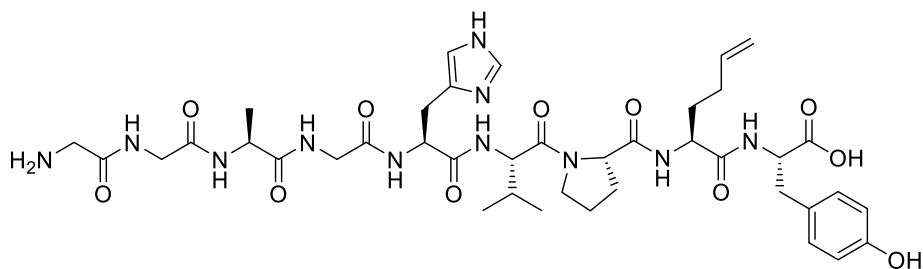


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **7** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	*	3.69	-	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.39	3.87	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.25	4.10	1.23	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.24	3.74	-	-	
<b>Phe<sup>5</sup></b>	7.93	*	2.86, 2.90	2,6-H	7.05 3,4,5-H 7.17
<b>Val<sup>6</sup></b>	7.81	4.03	1.93	Hγ	0.72, 0.75
<b>Pro<sup>7</sup></b>	*	4.18	1.86, 2.04	Hγ Hδ	1.59, 1.80 3.49
<b>Hag<sup>8</sup></b>	8.00	4.09	1.58, 1.61	Hγ CH CH <sub>2</sub>	1.81, 1.84 5.66 4.88
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.88	*	2.80, 3.00	2,6-H 3,5-H	6.98 6.67

#### 6.4.8 Synthese von Peptid 8



H-GGAGHVPXY-OH (X = Hag)

$C_{40}H_{57}N_{11}O_{11}$  [867.96]

Das Peptid **8** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 und 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min.

**HPLC:**  $t_R = 17.85$  min (10% - 40% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{40}H_{57}N_{11}O_{11}Na^+$   $[M+Na^+]$ , ber.: 890.4131, gef.: 890.4138.

**$^1H$ -NMR:** 300 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

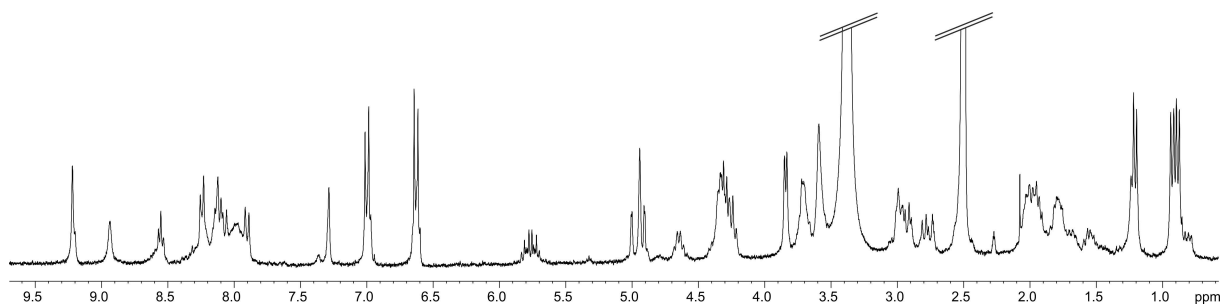
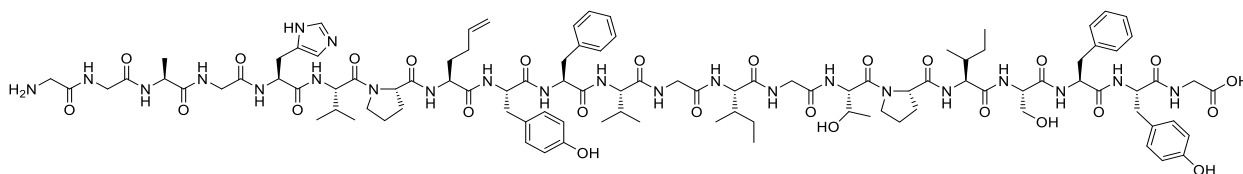




Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **8** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Gly</b> <sup>1</sup>	8.01	3.59	-	-	
<b>Gly</b> <sup>2</sup>	8.56	3.71	-	-	
<b>Ala</b> <sup>3</sup>	8.25	4.28	1.21	-	
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	8.14	3.84	-	-	
<b>His</b> <sup>5</sup>	8.24	4.64	2.80, 2.93	2-H 5-H	8.94 7.29
<b>Val</b> <sup>6</sup>	8.13	4.29	1.96	H $\gamma$	0.88, 0.93
<b>Pro</b> <sup>7</sup>	*	4.31	1.82, 2.05	H $\gamma$ H $\delta$	1.77, 2.00 3.59, 3.68
<b>Hag</b> <sup>8</sup>	8.07	4.23	1.57, 1.69	H $\gamma$ CH CH <sub>2</sub>	1.99 5.76 4.94
<b>Tyr</b> <sup>9</sup>	7.90	4.33	2.79, 2.98	2,6-H 3,5-H	7.00 6.63

### 6.4.9 Synthese von Peptid 9



H-GGAGHVPXYFVGIGTPISFYG-OH (X = Hag)

$C_{102}H_{143}N_{23}O_{26}$  [2107.40]

Das Peptid **9** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 und 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter etwas milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min. Alternativ erfolgte die Abspaltung mit HFIP/DCM 4:1 für 30 min bei RT, wodurch das vollständig geschützte Derivat erhalten wurde.

**HR-MS (ESI):** für  $C_{102}H_{143}N_{23}O_{26}H_2^{2+}$  [ $M+2H^+$ ], ber.: 1054.5375, gef.: 1054.5362.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 9:1.

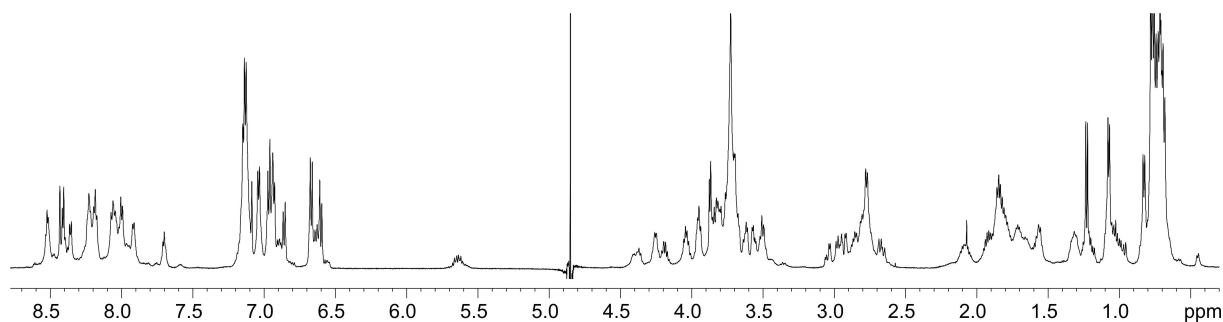


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **9** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	*	4.37	-	-	-
<b>Gly<sup>2</sup></b>	7.70	3.73	-	-	-
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.41	4.17	1.23	-	-
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.24	4.19	-	-	-
<b>His<sup>5</sup></b>	8.36	4.57	2.97, 3.04	2-H 5-H	7.09 8.43
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.23	4.27	1.93	Hγ	0.77, 0.83
<b>Pro<sup>7</sup></b>	*	4.20	1.86, 2.06	Hγ Hδ	1.57, 1.81 3.50, 3.71
<b>Hag<sup>8</sup></b>	8.23	4.02	1.84, 1.91	Hγ CH CH <sub>2</sub>	1.56 5.64 4.88
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.92	4.38	2.75	2,6-H 3,5-H	6.86 6.60
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.06	4.38	2.66, 2.93	2-6-H	7.04-7.14
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.22	3.95	1.65	Hγ	0.69
<b>Gly<sup>12</sup></b>	8.40	3.74	-	-	-
<b>Ile<sup>13</sup></b>	8.04	4.04	1.70	Hγ Hγ Hδ	1.70 1.04 0.77
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.52	3.81	-	-	-
<b>Thr<sup>15</sup></b>	8.00	4.41	3.96	Hγ	1.07
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.21	1.88, 2.04	Hγ Hδ	1.59, 1.80 3.49, 3.69
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.00	3.84	1.84	Hγ Hγ Hδ	1.70 1.05 0.73
<b>Ser<sup>18</sup></b>	8.19	4.25	3.57, 3.62	-	-
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.18	4.36	2.77	2-6-H	7.04-7.14
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	8.07	4.37	2.67, 2.92	2,6-H 3,5-H	6.96 6.66
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.51	3.87	-	-	-

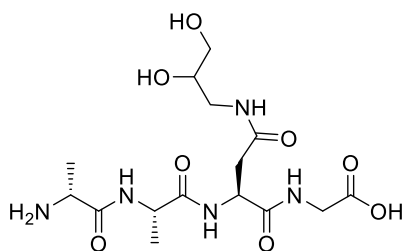


Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **10** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K.

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>ala</b> <sup>1</sup>	8.04	3.88	1.34	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	8.57	4.43	1.23	-	
<b>Glu</b> <sup>3</sup>	8.23	4.27	1.77, 1.89	H $\gamma$	2.16
<b>Gld</b> <sup>3a</sup>	7.71	3.28	3.47	H $\gamma$ OH	2.97, 3.19 4.53, 4.75
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	8.15	3.76	-	-	

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ )/ppm) von Peptid **10** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>ala</b> <sup>1</sup>	48.5	17.6	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	48.6	18.8	-	
<b>Glu</b> <sup>3</sup>	52.5	28.6	C $\gamma$	32.0
<b>Gld</b> <sup>3a</sup>	63.9	70.7	C $\gamma$	42.4
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	40.9		-	



C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [405.41]

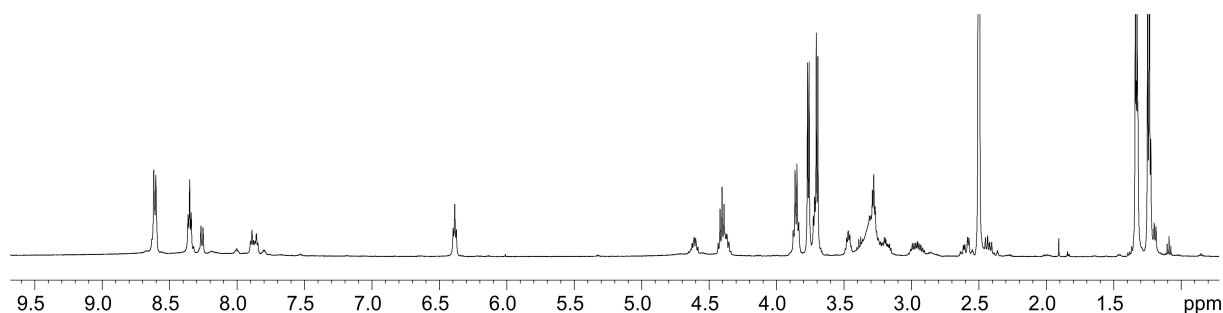


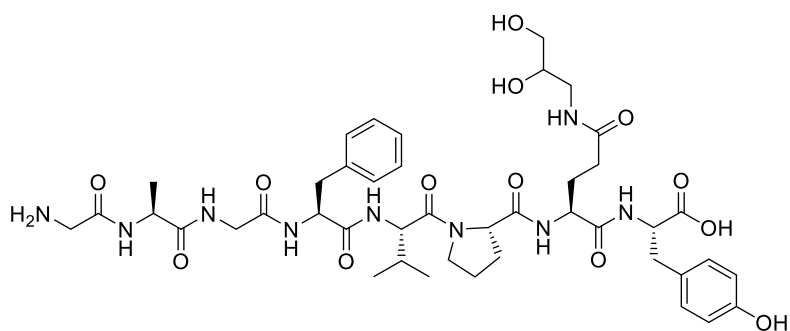
Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **11** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>ala</b> <sup>1</sup>	*	3.86	1.33	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	8.61	4.40	1.24	-	
<b>Asp</b> <sup>3</sup>	8.26	4.61	2.44, 2.61		
<b>Gld</b> <sup>3a</sup>	7.89, 7.86	3.27, 3.72	3.47	H $\gamma$ OH	2.96, 3.20 *
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	8.35	3.77	-	-	

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ )/ppm) von Peptid **11** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>ala</b> <sup>1</sup>	48.5	17.7	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	48.4	18.9	-	
<b>Asp</b> <sup>3</sup>	50.0	37.9	-	
<b>Gld</b> <sup>3a</sup>	64.0	70.8	C $\gamma$	42.6
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	41.0	-	-	

### 6.4.12 Synthese von Peptid 12



H-GAGFVPXY-OH (X = Glu[Gld])

$C_{43}H_{61}N_9O_{13}$  [912.01]

Das Peptid **12** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter etwas milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min.

**HPLC:**  $t_R = 16.26$  min (10% - 30% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{43}H_{61}N_9O_{13}Na^+$  [ $M+Na^+$ ], ber.: 934.4281, gef.: 934.4280.

**$^1H$ -NMR:** 500 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

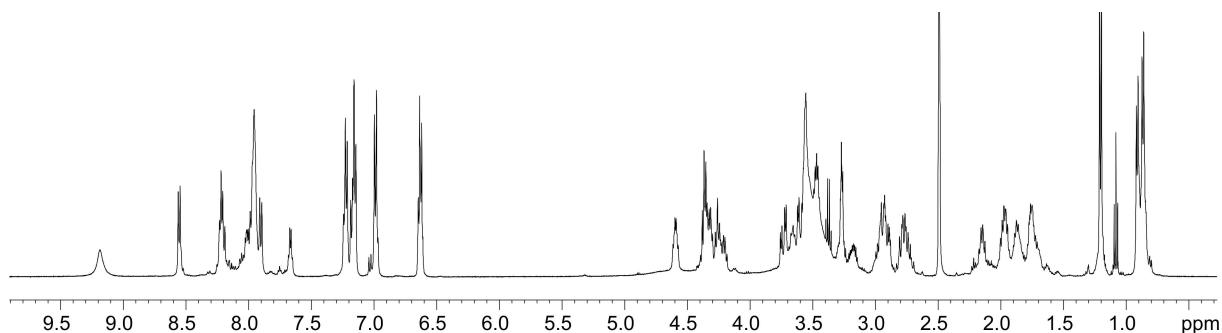
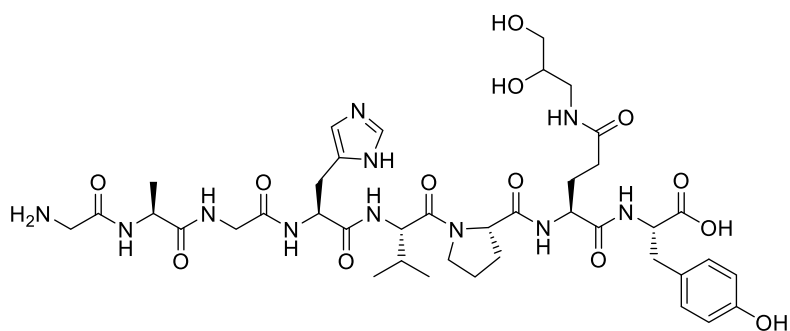




Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **12** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	7.96	3.57	-	-	
<b>Ala<sup>2</sup></b>	8.56	4.37	1.21	-	
<b>Gly<sup>3</sup></b>	8.22	3.61, 3.74	-	-	
<b>Phe<sup>4</sup></b>	7.91	4.60	2.77, 2.96	2-6-H	7.15-7.25
<b>Val<sup>5</sup></b>	8.21	4.27	1.98	Hγ	0.88, 0.92
<b>Pro<sup>6</sup></b>	-	4.36	1.77, 1.99	Hγ Hδ	1.76, 1.89 3.55, 3.68
<b>Glu<sup>7</sup></b>	8.00	4.21	1.72, 1.88	Hγ	2.16
<b>Gld<sup>7a</sup></b>	7.67	3.28	3.48	Hγ OH	2.98, 3.20 *
<b>Tyr<sup>8</sup></b>	7.98	4.32	2.81, 2.91	2,6-H 3,5-H	6.63 7.00

### 6.4.13 Synthese von Peptid 13



H-GAGHVPXY-OH (X = Glu[Gld])

$C_{40}H_{59}N_{11}O_{13}$  [901.98]

Das Peptid **13** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.3 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter etwas milderen Bedingungen mit wässriger TFA (95%ig) bei 0 °C für 30 min.

**HPLC:**  $t_R = 9.88$  min (10% - 30% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{40}H_{59}N_{11}O_{13}Na^+$   $[M+Na^+]$ , ber.: 924.4186, gef.: 924.4195.

**$^1H$ -NMR:** 500 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

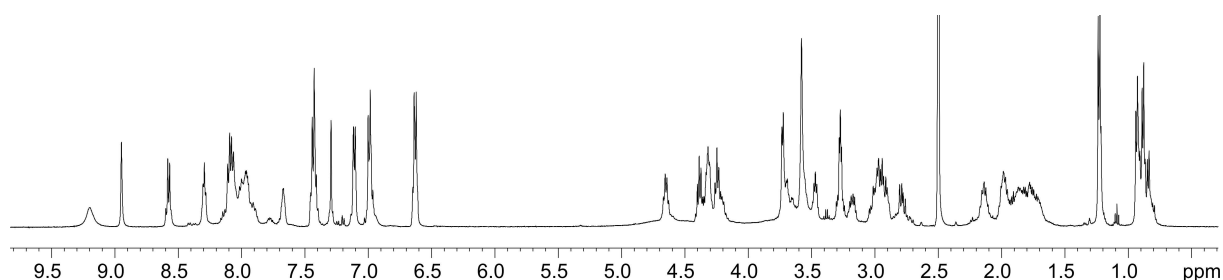
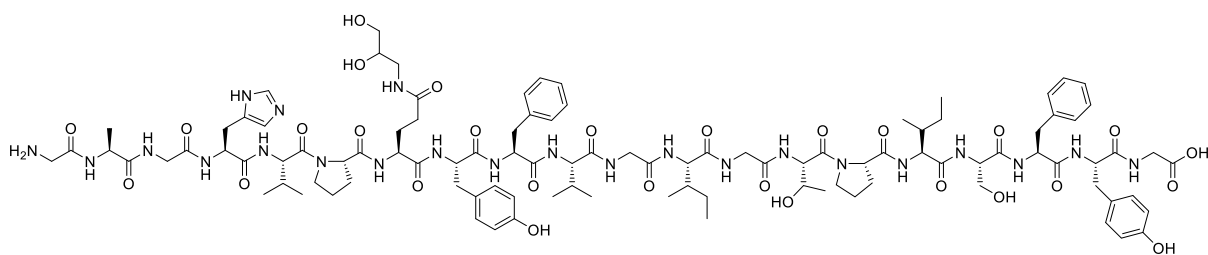


Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **13** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	8.06	3.59	-	-	
<b>Ala<sup>2</sup></b>	8.57	4.38	1.23	-	
<b>Gly<sup>3</sup></b>	8.30	3.72	-	-	
<b>His<sup>4</sup></b>	8.10	4.66	3.00	2-H 5-H	8.95 7.30
<b>Val<sup>5</sup></b>	8.09	4.26	1.98	H $\gamma$	0.88, 0.93
<b>Pro<sup>6</sup></b>	-	4.33	1.80, 1.92	H $\gamma$ H $\delta$	1.77, 1.87 3.56, 3.70
<b>Glu<sup>7</sup></b>	7.95	4.22	1.71, 1.87	H $\gamma$	2.15
<b>Gld<sup>7a</sup></b>	7.67	3.28	3.47	H $\gamma$ OH	2.97, 3.18 *
<b>Tyr<sup>8</sup></b>	8.07	4.33	2.79, 2.92	2,6-H 3,5-H	6.63 6.99

## 6.4.14 Synthese von Peptid 14



H-GAGHVPXYFVGIGTPISFYG-OH (X = Glu[Gld])

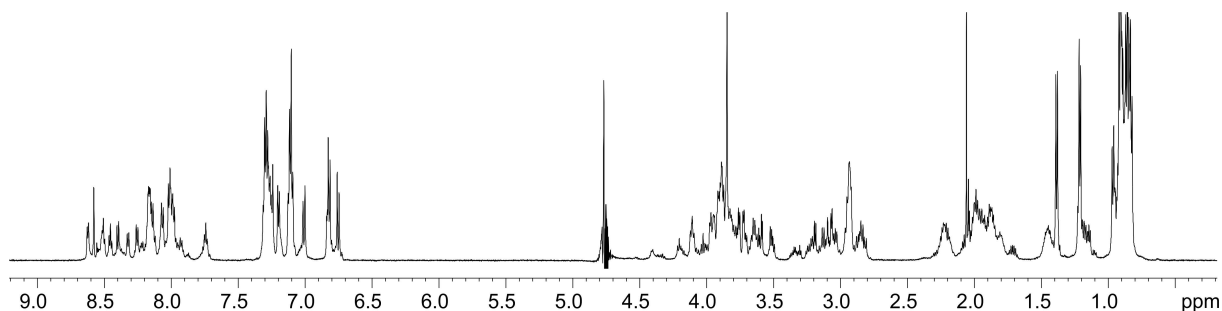
$C_{102}H_{145}N_{23}O_{28}$  [2141.42]

Das Peptid **14** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *Apex 360 Synthesizer* auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte unter milderen Bedingungen mit der Abspatlösung B bei 0 °C für 30 min.

**HPLC:**  $t_R = 15.64$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

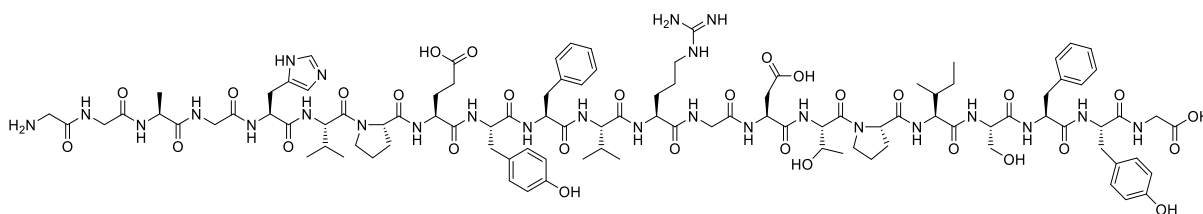
**HR-MS (ESI):** für  $C_{102}H_{145}N_{23}O_{28}H_2^{2+}$  [M+2H<sup>+</sup>], ber.: 1071.5401, gef.: 1071.5397.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.



Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu Peptid **9**, der hohen Signalüberlappung und der geringen Ausbeute wurde auf eine vollständige NMR-spektroskopische Zuordnung dieses Peptids verzichtet. HPLC-Chromatogramme, massenspektroskopische Untersuchungen und das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum belegen die ausreichende Reinheit der Verbindung.

### 6.4.15 Synthese von Peptid 15



H-GGAGHVPEYFVRGDTPISFYG-OH

C<sub>103</sub>H<sub>144</sub>N<sub>26</sub>O<sub>30</sub> [2226.44]

Das Peptid **15** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *Apex 360 Synthesizer* auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte nach 6.2.4 mit der Abspatlösung B.

**HPLC:**  $t_R = 10.99$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

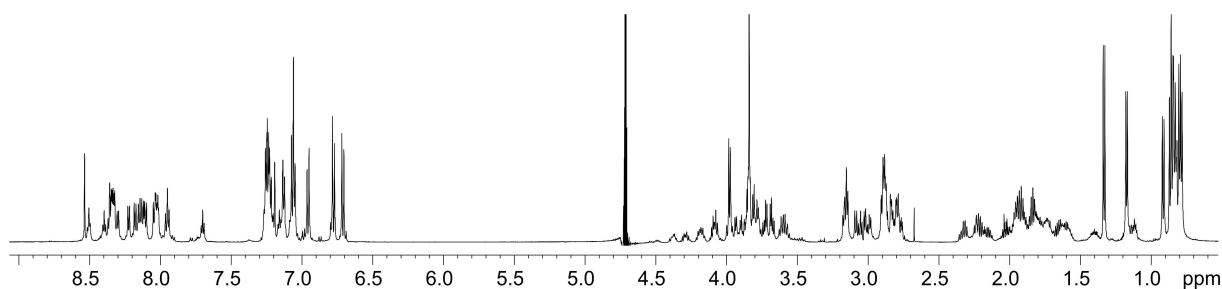
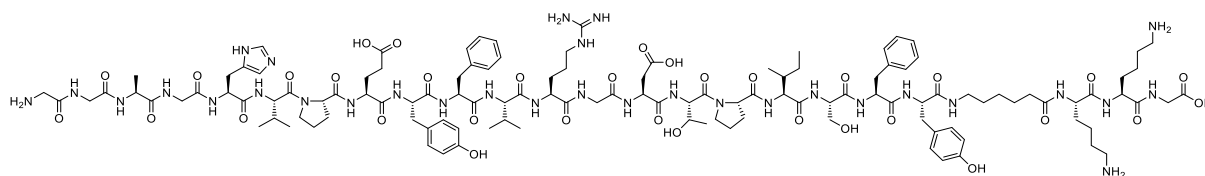


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **15** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	*	*	-	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	7.74	3.87	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.39	4.34	1.38	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	*	*	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	*	4.73	3.12, 3.21	2-H	8.58
				5-H	7.23
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.22	4.41	2.07	Hγ	0.91, 0.96
<b>Pro<sup>7</sup></b>	*	4.33	2.00, 2.20	Hγ	1.69, 1.94
				Hδ	3.62, 3.83
<b>Glu<sup>8</sup></b>	8.27	4.22	2.27, 2.35	Hγ	1.87
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.99	4.38	2.90	2,6-H	7.00
				3,5-H	6.75
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.06	4.60	2.83, 3.08	2-6-H	7.17-7.30
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.00	4.03	1.98	0.89	
<b>Arg<sup>12</sup></b>	8.35	4.24	1.77, 1.84	Hγ	1.65
				Hδ	3.20
<b>Gly<sup>13</sup></b>	8.44	3.97	-	-	
<b>Asp<sup>14</sup></b>	*	*	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	8.09	4.57	4.13	Hγ	1.22
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.42	2.00, 2.25	Hγ	1.89, 1.95
				Hδ	3.65, 3.82
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.19	4.11	2.95	Hγ	1.79
				Hγ	1.16
				Hδ	0.83
<b>Ser<sup>18</sup></b>	8.17	4.41	3.72, 3.77	-	
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.38	4.72	2.84	2-6-H	7.16-7.29
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	8.15	4.54	2.93	2,6-H	7.11
				3,5-H	6.82
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.55	4.02	-	-	

## 6.4.16 Synthese von Peptid 16



H-GGAGHVPEYFVVGIGTPISFYXKKG-OH (X = Ahx)

$C_{121}H_{179}N_{31}O_{33}$  [2595.95]

Das Peptid **16** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *Apex 360 Synthesizer* auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte nach 6.2.4 mit der Abspatlösung B.

**HPLC:**  $t_R = 12.00$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

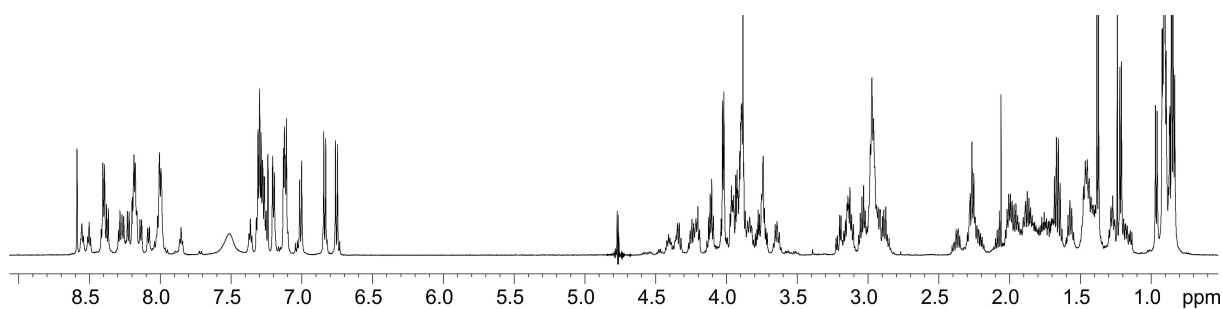
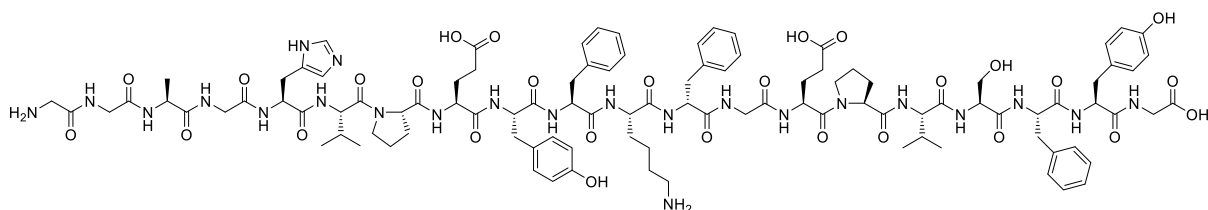




Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **16** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1/2</sup></b>	*	3.75	-	-	-
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.25	4.19	1.23	-	-
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.13	3.76	-	-	-
<b>His<sup>5</sup></b>	8.22	4.56	2.97, 3.06	2-H 5-H	8.44 7.09
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.08	4.26	2.17	Hγ	0.76, 0.81
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.19	1.83, 2.08	Hγ Hδ	1.56, 1.73, 3.57, 3.70
<b>Glu<sup>8</sup></b>	8.11	4.07	2.13, 2.22	Hγ	1.73
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.85	4.44	2.75, 2.89	2,6-H 3,5-H	6.86 6.61
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.22	4.56	2.99	2-6-H	6.96-7.17
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.07	4.27	1.93	Hγ	0.76, 0.82
<b>Gly<sup>12</sup></b>	8.03	3.95	-	-	-
<b>Ile<sup>13</sup></b>	8.04	3.96	1.66	Hγ Hδ	0.75, 1.02, 1.31 0.70
<b>Gly<sup>14</sup></b>	*	*	-	-	-
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.85	4.42	3.97	Hγ	1.07
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.18	1.85, 2.06	Hγ Hδ	1.75, 1.58 3.60, 3.69
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.03	4.11	1.72	Hγ Hδ	0.72, 1.08, 1.29 0.68
<b>Ser<sup>18</sup></b>	8.02	4.25	3.58, 3.63	-	-
<b>Phe<sup>19</sup></b>	7.93	4.42	2.80, 2.89	2-6-H	7.05-7.16
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	7.99	4.54	2.74, 2.89	2,6-H 3,5-H	6.97 6.69
<b>Ahx<sup>21</sup></b>	7.21	2.12	1.31	Hγ Hδ Hε	1.42 1.12 2.99
<b>Lys<sup>22/23</sup></b>	8.25	4.61	1.60, 1.69	Hγ Hδ Hε	1.27 1.52 2.82
<b>Gly<sup>24</sup></b>	7.70	3.60	-	-	-

### 6.4.17 Synthese von Peptid 17



H-GGAGHVPEYFKfGEPVSFYG-OH

$C_{103}H_{139}N_{23}O_{28}$  [2147.36]

Das Peptid **17** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *Apex 360 Synthesizer* in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte nach 6.2.4 mit der Abspatlösung B.

**HPLC:**  $t_R = 11.38$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{103}H_{139}N_{23}O_{28}Na_2^{2+}$  [ $M+2Na^+$ ], ber.: 1096.4987, gef.: 1096.4989.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

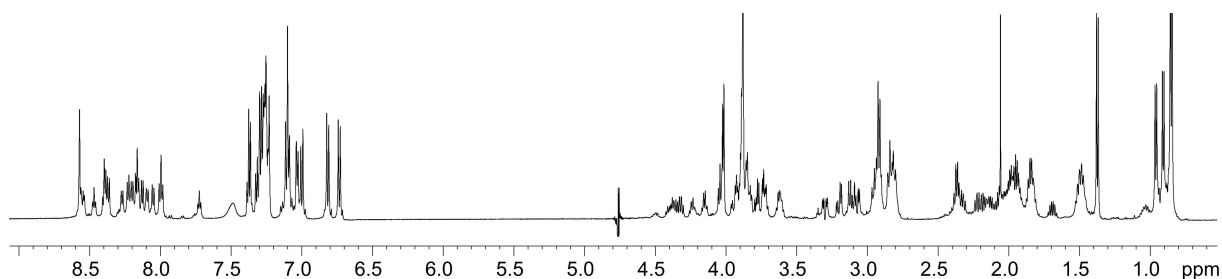
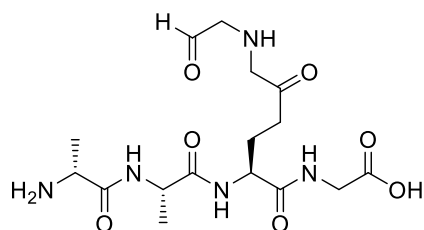


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **17** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	*	*	-	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.32	3.74	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.24	4.19	1.22	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.23	3.73	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.22	4.56	2.96, 3.05	2-H	8.42
				5-H	7.08
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.08	4.26	1.91	Hγ	0.76, 0.81
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.16	1.84, 2.02	Hγ	1.54, 1.81
				Hδ	3.47, 3.68
<b>Glu<sup>8</sup></b>	8.05	4.08	2.07, 2.18	Hγ	1.69
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.90	4.41	2.68, 2.77	2,6-H	6.85
				3,5-H	6.59
<b>Phe<sup>10</sup></b>	7.94	4.45	2.68, 2.79	2-6-H	6.94-7.16
<b>Lys<sup>11</sup></b>	7.33	4.00	1.69	Hγ	0.71, 0.89
				Hδ	1.35
				Hε	2.67
<b>phe<sup>12</sup></b>	8.41	4.52	2.80, 3.15	2-6-H	7.09-7.23
<b>Gly<sup>13</sup></b>	8.32	3.77	-	-	
<b>Glu<sup>14</sup></b>	7.84	4.53	1.69, 1.88	Hγ	2.22
<b>Pro<sup>15</sup></b>	-	4.23	1.85, 2.00	Hγ	1.69, 1.79
				Hδ	3.58, 3.63
<b>Val<sup>16</sup></b>	8.02	3.88	1.81	Hγ	0.72
<b>Ser<sup>17</sup></b>	8.01	4.24	3.58, 3.63	-	
<b>Phe<sup>18</sup></b>	7.98	4.34	2.77	2-6-H	7.09-7.23
<b>Tyr<sup>19</sup></b>	7.94	4.42	2.69, 2.79	2,6-H	6.95
				3,5-H	6.66
<b>Gly<sup>20</sup></b>	7.58	3.71	-	-	

### 6.4.18 Synthese von Peptid 18



H-aAXG-OH (X = Glu[Gla])

$C_{16}H_{27}N_5O_7$  [401.42]

Das Peptid **18** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte mit der Abspatlösung C in 1 h.

**HPLC:**  $t_R = 3.56$  min (5% - 10% MeCN in 10 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{16}H_{29}N_5O_8Na^+$  [ $M+H_2O+Na^+$ ], ber.: 442.1908, gef.: 442.1898.

**$^1H$ -NMR:** 500 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

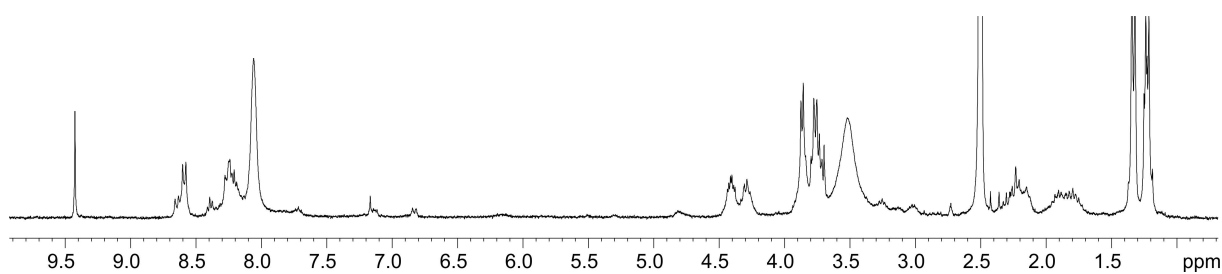
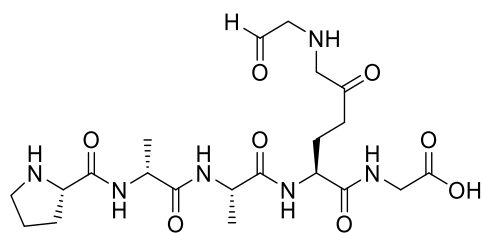


Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **18** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K.

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>ala</b> <sup>1</sup>	8.06	3.87	1.33	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	8.59	4.41	1.23	-	
<b>Glu</b> <sup>3</sup>	8.25	4.28	1.80, 1.91	2.15	
<b>Gla</b> <sup>3a</sup>	8.08	3.53	-	CHO	9.42
<b>Gly</b> <sup>4</sup>	8.19	3.73	-	-	

### 6.4.19 Synthese von Peptid 19



H-PaAXG-OH (X = Glu[Gla])

$C_{21}H_{34}N_6O_8$  [498.54]

Das Peptid **19** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte mit der Abspatlösung C in 1 h.

**HPLC:**  $t_R = 3.57$  min (5% - 10% MeCN in 10 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{22}H_{38}N_6O_9H^+$  [M+MeOH+H<sup>+</sup>], ber.: 531.2773, gef.: 531.2769.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

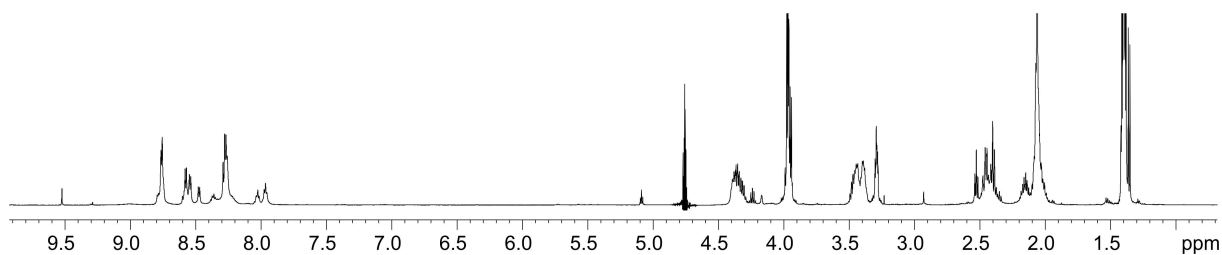


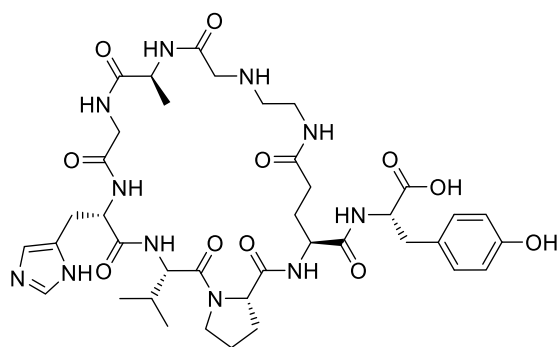
Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **19** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Pro</b> <sup>1</sup>	*	4.23	1.92, 2.31	H $\gamma$	1.88, 2.00
				H $\delta$	3.24, 3.29
<b>ala</b> <sup>2</sup>	8.41	4.22	1.25	-	
<b>Ala</b> <sup>3</sup>	8.61	4.18	1.24	-	
<b>Glu</b> <sup>4</sup>	8.11	4.21	2.00, 2.00	H $\gamma$	2.25
<b>Gla</b> <sup>4a</sup>	7.82, 7.88	3.14, 3.32	-	CHO	9.37
				CH(OH) <sub>2</sub>	4.94
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	8.13	4.21	-	-	

Tabelle:  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **19** aus dem HSQC-Spektrum, 300 K.

Aminosäure	C $\alpha$	C $\beta$	weitere	
<b>Pro</b> <sup>1</sup>	59.6	29.6	C $\gamma$	26.9
			C $\delta$	46.6
<b>ala</b> <sup>2</sup>	49.8	16.4	-	
<b>Ala</b> <sup>3</sup>	49.9	16.5	-	
<b>Glu</b> <sup>4</sup>	52.9	31.6	C $\gamma$	23.4
<b>Gla</b> <sup>4a</sup>	45.2	-	CH(OH) <sub>2</sub>	88.3
<b>Gly</b> <sup>5</sup>	49.9	-	-	

## 6.4.20 Synthese von Peptid 20



cycloamino-[GAGHVPX]Y-OH (X = Glu[Gla])

$C_{39}H_{55}N_{11}O_{11}$  [853.94]

Das Peptid **20** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der Festphasenpeptidsynthese 6.2.2 bis 6.2.4 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte mit der Abspatlösung C in 1 h. Post-synthetisch wurde mittels  $NaBH_3CN$  (3.0 eq) in  $AcOH/H_2O$  1:1 der N-Terminus und der Aldehyd reduktiv aminiert.

**HPLC:**  $t_R = 12.65$  min (10% - 30% MeCN in 20 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{39}H_{55}N_{11}O_{11}H^+$   $[M+H^+]$ , ber.: 854.4083, gef.: 854.4152.

**$^1H$ -NMR:** 500 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

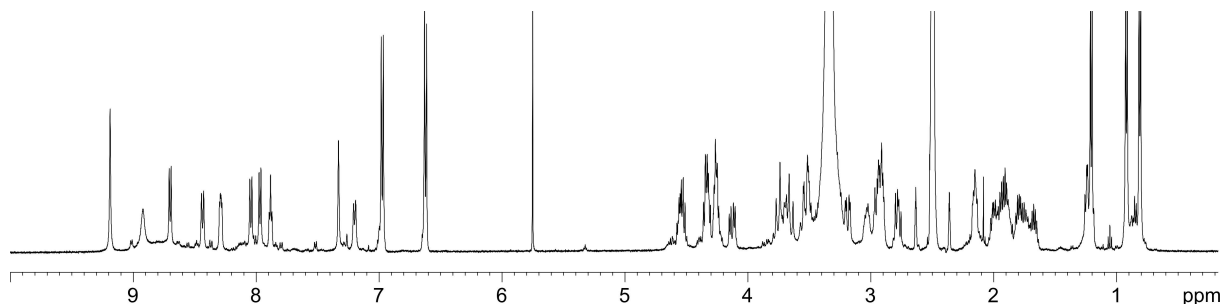
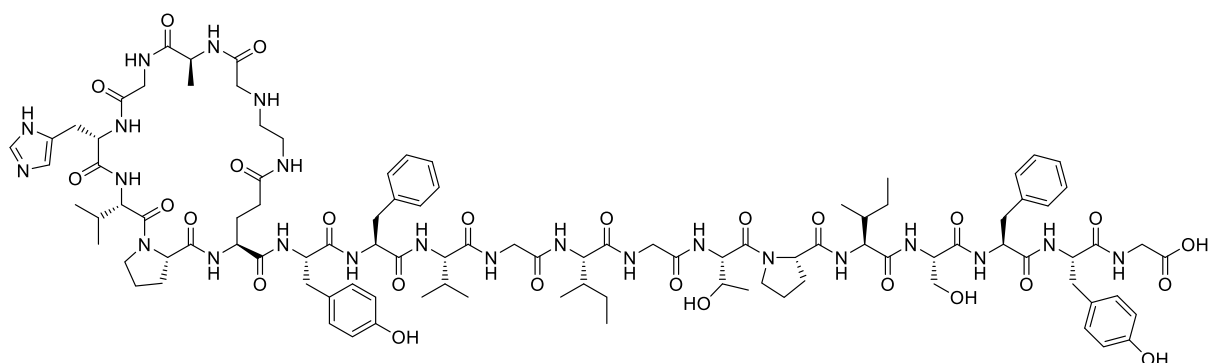




Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **20** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly</b> <sup>1</sup>	*	3.66	-	-	
<b>Ala</b> <sup>2</sup>	8.70	4.53	1.21	-	
<b>Gly</b> <sup>3</sup>	8.29	3.54, 3.74	-	-	
<b>His</b> <sup>4</sup>	8.44	4.56	2.95, 3.19	2-H	8.92
				5-H	7.33
<b>Val</b> <sup>5</sup>	7.20	4.34	1.95	Hγ	0.81, 0.92
<b>Pro</b> <sup>6</sup>	-	4.27	1.80, 2.00	Hγ	1.67, 1.91
				Hδ	3.51, 3.70
<b>Glu</b> <sup>7</sup>	8.05	4.26	1.73, 1.89	Hγ	2.16
<b>Gla</b> <sup>7a</sup>	7.88	3.27, 3.39	2.91, 3.04	-	
<b>Tyr</b> <sup>8</sup>	7.97	4.33	2.78, 2.92	2,6-H	6.98
				3,5-H	6.62
				OH	9.19

## 6.4.21 Synthese von Peptid 21



cycloamino-[GAGHVPX]YFVGIGTPISFYG-OH (X = Glu[Gla])

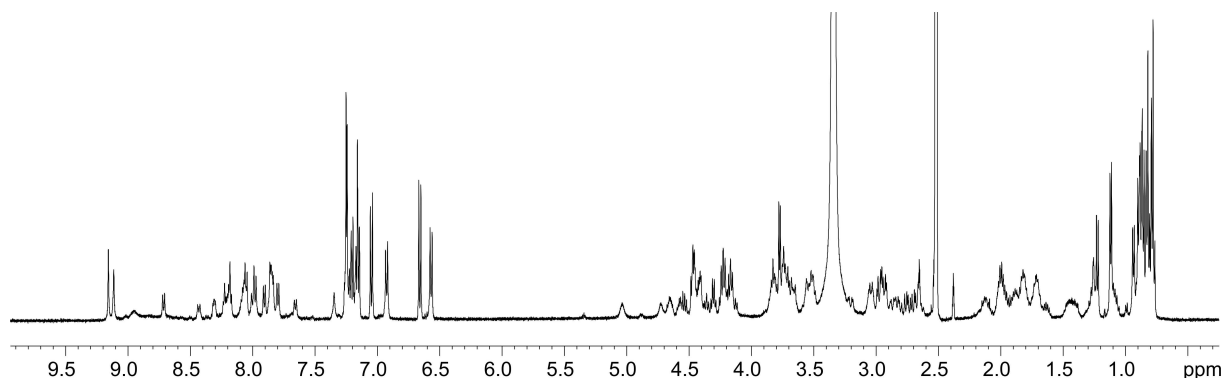
$C_{101}H_{143}N_{23}O_{28}$  [2126.38]

Das Peptid **21** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte mit der Abspatlösung C in 2 h. Post-synthetisch wurde mittels  $NaBH_3CN$  (3.0 eq) in  $AcOH/H_2O$  1:1 der N-Terminus und der Aldehyd reduktiv aminiert.

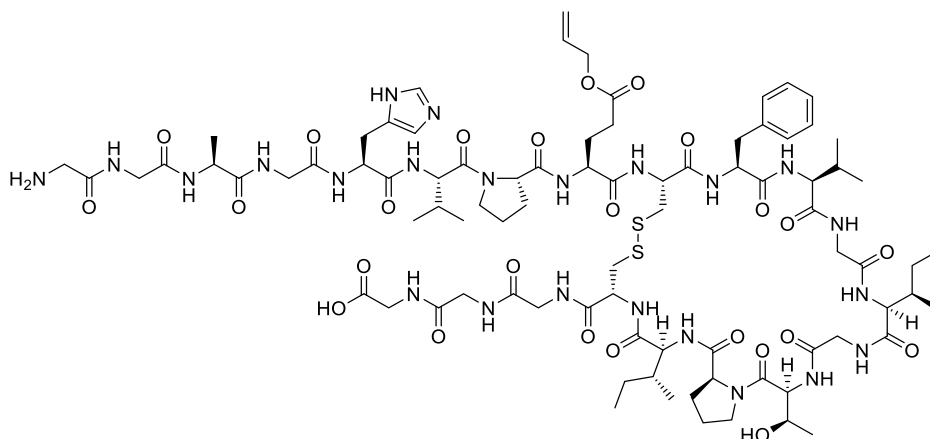
**HPLC:**  $t_R = 13.76$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{101}H_{143}N_{23}O_{28}H_2^{2+}$   $[M+2H^+]$ , ber.: 1047.5297, gef.: 1047.5269.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .



## 6.4.22 Synthese von Peptid 22



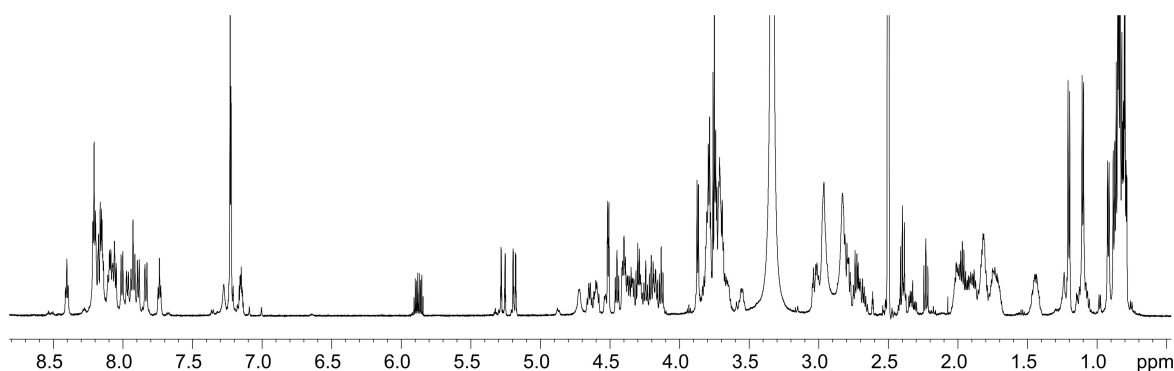
$S^9, S^{18}$ -cyclo-GGAGHVPE(OAll)CFVGIGTPICFYG-OH

$C_{84}H_{127}N_{23}O_{25}S_2$  [1923.20]

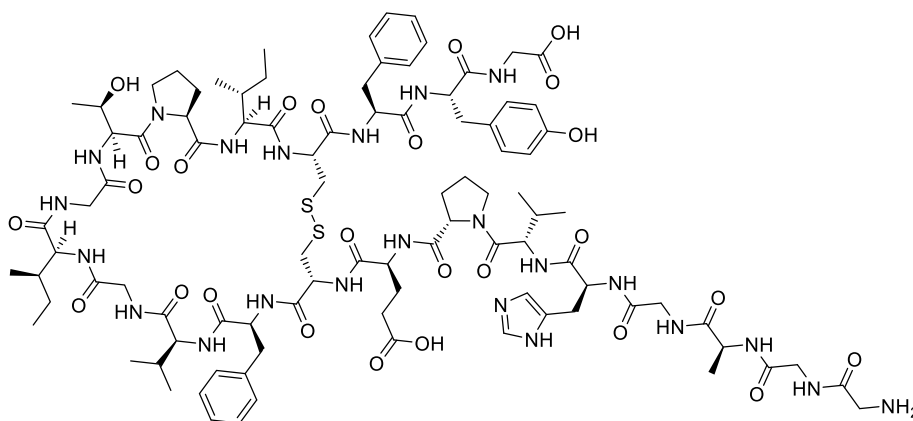
Das Peptid **22** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^9, S^{18}$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Durch die orthogonale Schutzgruppe der Glutaminsäure<sup>8</sup> sollte eine Cyclisierung an der festen Phasen erfolgen, um anschließend das Disulfid zu bilden.

**HPLC:**  $t_R = 13.20$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO_{d6}$ .



## 6.4.23 Synthese von Peptid 23



$S^9,S^{18}$ -cyclo-GGAGHVPECFVIGITPICFYG-OH

$C_{95}H_{135}N_{23}O_{26}S_2$  [2079.38]

Das Peptid **23** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 mit der Abspatlösung B und das Disulfid  $S^9,S^{18}$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten.

**HPLC:**  $t_R = 14.68$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{95}H_{135}N_{23}O_{26}S_2H_2^{2+}$  [ $M+2H^+$ ], ber.: 1040.4782, gef.: 1040.4780.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .

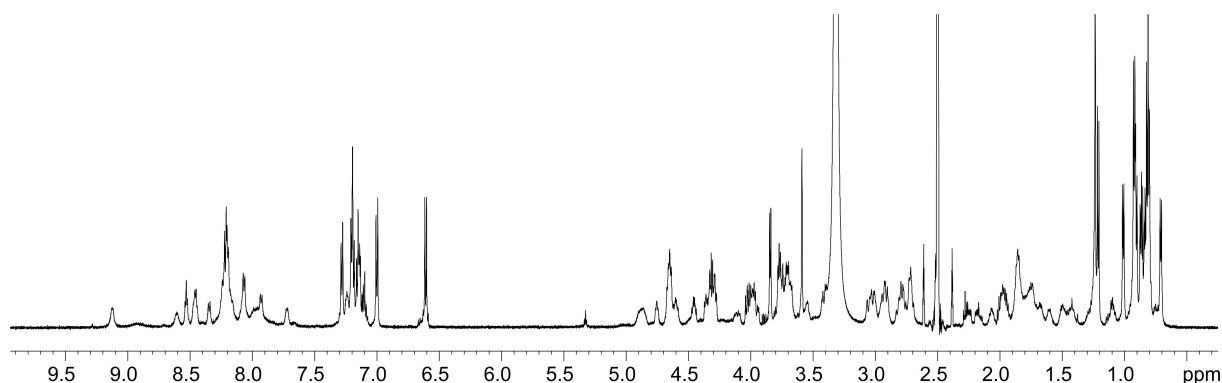
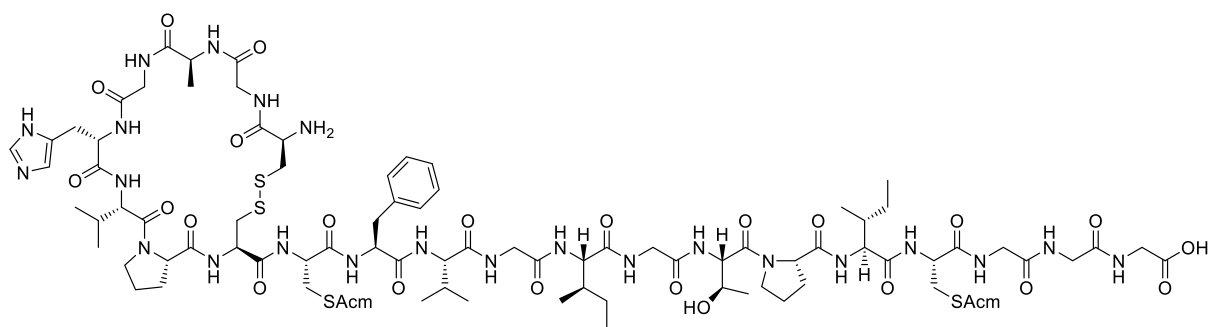


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **23** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	*	3.60	-	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.53	3.84	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.21	4.31	1.21	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.20	3.74	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.07	4.29	2.95, 3.05	*	
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.06	4.28	1.98	Hγ	0.87, 0.92
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.35	1.89, 2.03	Hγ Hδ	1.64, 1.89 3.56, 3.78
<b>Glu<sup>8</sup></b>	7.93	4.32	2.18, 2.25	Hγ	1.67, 1.84
<b>Cys<sup>9</sup></b>	*	*	*	-	
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.23	4.86	2.80, 2.93	2-6-H	7.13-7.29
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.47	4.00	1.95	Hγ	0.92
<b>Gly<sup>12</sup></b>	7.72	3.73, 4.10	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	8.19	4.03	1.79	Hγ Hγ Hδ	1.10, 1.49 0.91 0.71
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.45	3.41, 3.96	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.24	4.65	3.97	Hγ	1.01
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.76	*	*	
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.20	4.31	1.60	Hγ Hγ Hδ	1.20, 1.60 0.85 0.81
<b>Cys<sup>18</sup></b>	8.61	4.89	2.72	-	
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.17	4.60	2.78, 3.02	2-6-H	7.13-7.21
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	8.35	4.45	2.71, 2.91	2,6-H 3,5-H	7.00 6.61
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.19	3.73	-	-	

## 6.4.24 Synthese von Peptid 24



S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup>-cyclo-CGAGHVPCC(Acm)FVGIGTPIC(Acm)GGG-OH

C<sub>86</sub>H<sub>133</sub>N<sub>25</sub>O<sub>25</sub>S<sub>4</sub> [2045.40]

Das Peptid **24** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup> wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt.

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 9.64 min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>.

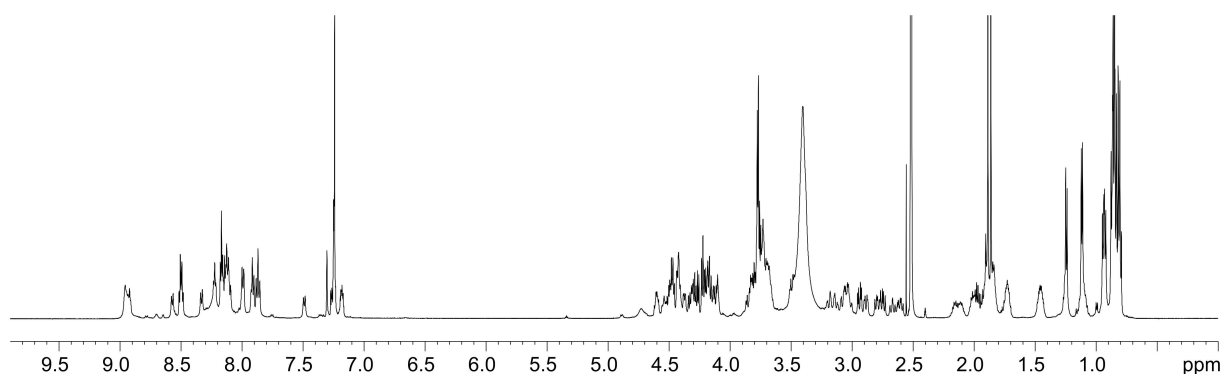


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **24** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Cys<sup>1</sup></b>	*	*	*	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.93	3.68, 4.14	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	7.90	4.28	1.22	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.90	3.48, 3.67	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.32	4.40	3.01, 3.37	2-H	8.94
				5-H	7.29
<b>Val<sup>6</sup></b>	7.47	4.40	2.14	Hγ	0.91, 0.93
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.36	1.82, 2.14	Hγ	1.83, 2.00
				Hδ	3.68
<b>Cys<sup>8</sup></b>	8.55	4.52	2.65, 3.06	-	
<b>Cys<sup>9</sup></b>	8.09	4.48	2.71, 2.92	CH <sub>3</sub>	1.84
<b>Phe<sup>10</sup></b>	7.98	4.59	2.78, 3.02	2-6-H	7.16-7.26
<b>Val<sup>11</sup></b>	7.97	4.18	1.97	Hγ	0.85
<b>Gly<sup>12</sup></b>	8.11	3.77	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	7.86	4.15	1.72	Hγ	1.11, 1.45
				Hγ	0.82
				Hδ	0.79
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.48	4.24	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.87	4.46	3.79	Hγ	1.10
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.13	1.82, 2.10	Hγ	1.88, 2.00
				Hδ	3.46, 3.72
<b>Ile<sup>17</sup></b>	7.84	4.20	1.71	Hγ	1.09, 1.43
				Hγ	0.86
				Hδ	0.80
<b>Cys<sup>18</sup></b>	*	*	2.86, 3.05	CH <sub>3</sub>	1.87
<b>Gly<sup>19</sup></b>	8.15	3.75	-	-	
<b>Gly<sup>20</sup></b>	8.46	4.09, 4.31	-	-	
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.20	3.75	-	-	

## 6.4.25 Synthese von Peptid 25

 $S^1, S^9: S^{10}, S^{18}$ -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICGGG-OH $C_{80}H_{121}N_{23}O_{24} S_4$  [1901.23]

Das Peptid **25** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 sind während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acem-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ, iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

**HPLC:**  $t_R = 11.71$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO_{d6}$ .

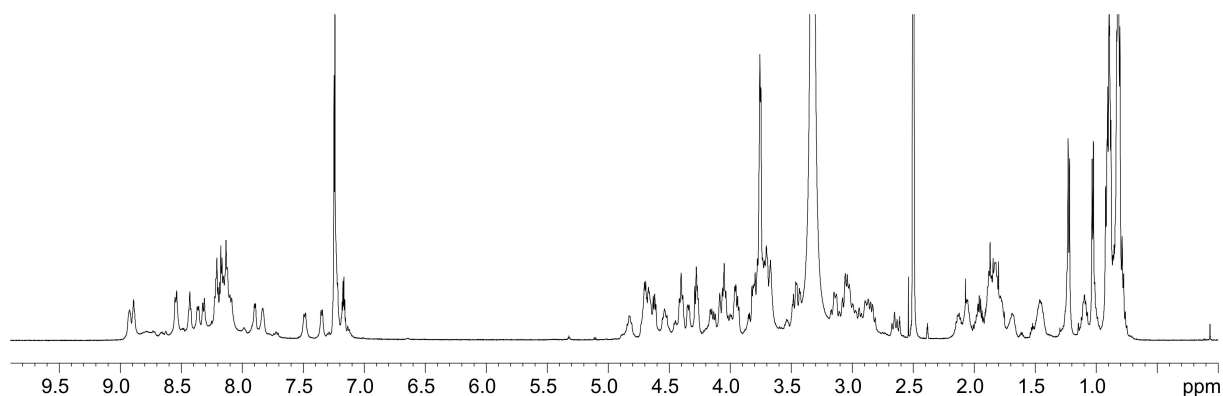
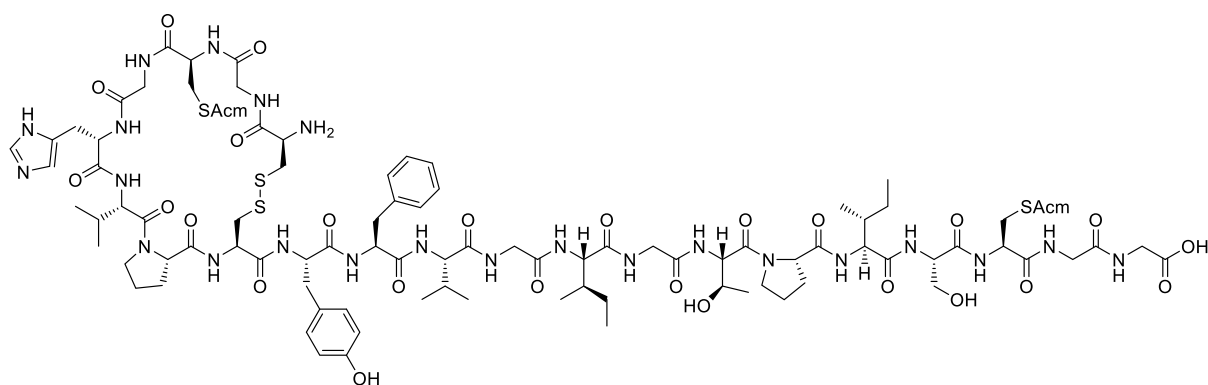




Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **25** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Cys<sup>1</sup></b>	*	*	*	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.93	3.70, 4.16	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	7.90	4.29	1.23	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.89	3.49, 3.69	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.32	4.39	2.99, 3.32	2-H 5-H	* 7.24
<b>Val<sup>6</sup></b>	7.49	4.40	2.13	Hγ	0.90
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.38	1.80, 2.12	Hγ Hδ	1.88, 2.01 3.69
<b>Cys<sup>8</sup></b>	8.54	4.54	2.65, 3.06	-	
<b>Cys<sup>9</sup></b>	8.22	4.71	2.89, 2.94	-	
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.16	4.65	2.83, 3.03	2-6-H	7.16-7.25
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.36	4.06	1.94	Hγ	0.89
<b>Gly<sup>12</sup></b>	7.83	3.77, 4.00	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	8.12	4.04	1.76	Hγ Hγ Hδ	1.10, 1.60 0.82 0.81
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.43	3.44, 3.94	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.35	4.62	3.96	Hγ	1.03
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	*	*	Hγ Hδ	* *
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.09	4.27	1.67	Hγ Hγ Hδ	1.00, 1.46 0.81 0.81
<b>Cys<sup>18</sup></b>	*	*	*	-	
<b>Gly<sup>19</sup></b>	8.16	3.74	-	-	
<b>Gly<sup>20</sup></b>	8.12	3.77	-	-	
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.19	3.76	-	-	

## 6.4.26 Synthese von Peptid 26



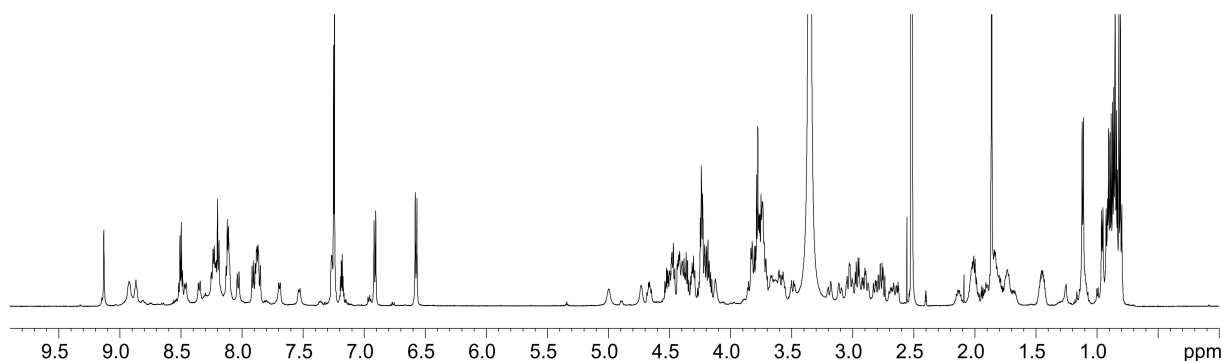
$S^1,S^9$ -cyclo-CGC(Acm)GHVPCYFVGIGTPISC(Acm)GG-OH

$C_{93}H_{139}N_{25}O_{27}S_4$  [2167.52]

Das Peptid **26** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1,S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 3 und 19 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt.

**HPLC:**  $t_R = 9.74$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .



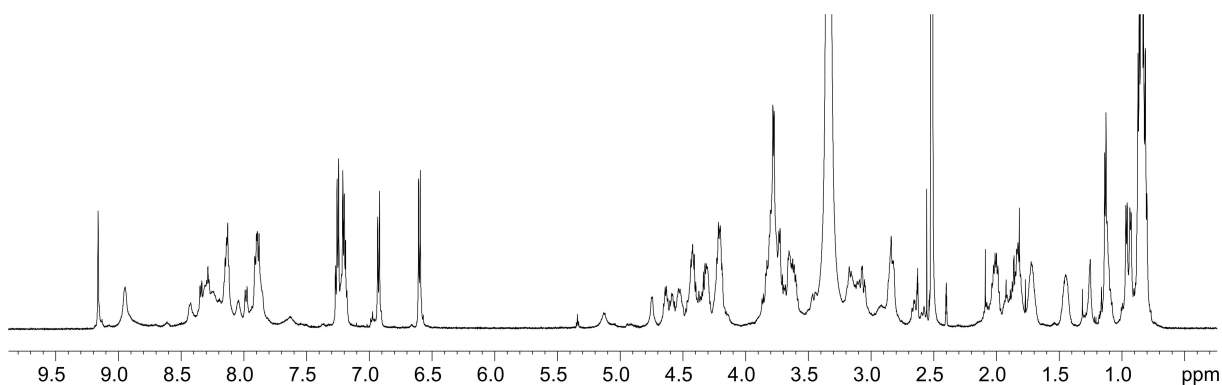
## 6.4.27 Synthese von Peptid 27

 $S^1, S^9: S^3, S^{19}$ -bicyclo-CGCGHVPCYFVGIGTPISCGG-OH $C_{87}H_{127}N_{23}O_{25}S_4$  [2023.35]

Das Peptid **27** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 3 und 19 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal AcM-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ sowie iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

**HPLC:**  $t_R = 10.80$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO_{d6}$ .



## 6.4.28 Synthese von Peptid 28



S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup>:S<sup>10</sup>,S<sup>18</sup>-bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFYG-OH

C<sub>94</sub>H<sub>133</sub>N<sub>23</sub>O<sub>24</sub>S<sub>4</sub> [2097.48]

Das Peptid **28** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup> wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ sowie iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

**HPLC:**  $t_R = 10.63$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für C<sub>94</sub>H<sub>133</sub>N<sub>23</sub>O<sub>24</sub>S<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na<sup>+</sup>], ber.: 2119.8697, gef.: 2119.8764.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>.

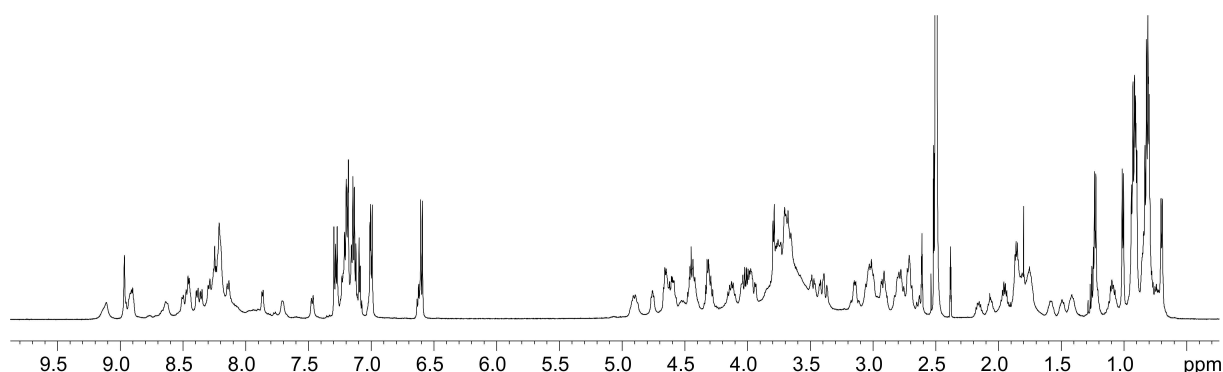


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **28** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Cys<sup>1</sup></b>	*	4.05	3.15	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.92	3.68, 4.15	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	7.87	4.32	1.23	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.90	3.48, 3.67	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.39	4.44	3.03, 3.38	2-H	8.97
				5-H	7.29
<b>Val<sup>6</sup></b>	7.47	4.43	2.16	Hγ	0.92
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.31	1.89, 2.07	Hγ	1.79, 2.05
				Hδ	3.63
<b>Cys<sup>8</sup></b>	8.47	4.59	2.63, 3.02	-	
<b>Cys<sup>9</sup></b>	8.30	4.89	2.80, 2.92	-	
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.25	4.64	2.81, 3.05	2-6-H	7.13-7.25
<b>Val<sup>11</sup></b>	8.51	4.00	1.95	Hγ	0.91, 0.93
<b>Gly<sup>12</sup></b>	7.71	3.72, 4.11	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	8.22	4.03	1.80	Hγ	1.10, 1.51
				Hγ	0.82
				Hδ	0.80
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.45	3.41, 3.95	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.23	4.66	3.98	Hγ	1.01
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.76	1.86, 2.07	Hγ	1.77, 1.85
				Hδ	3.17, 3.73
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.21	4.29	1.59	Hγ	0.94, 1.40
				Hγ	0.80
				Hδ	0.70
<b>Cys<sup>18</sup></b>	8.63	4.92	2.72	-	
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.14	4.60	2.78, 3.00	2-6-H	7.13-7.21
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	8.36	4.45	2.71, 2.92	2,6-H	7.00
				3,5-H	6.60
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.25	3.79	-	-	

## 6.4.29 Synthese von Peptid 29

 $S^1, S^9: S^{10}, S^{18}$ -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFYG-OH $\text{C}_{94}\text{H}_{133}\text{N}_{23}\text{O}_{24}\text{S}_4$  [2097.48]

Das Peptid **29** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab analog dem Peptid **28** synthetisiert. In diesem Fall wurde die Schutzgruppenstrategie der Cysteine umgekehrt und die Oxidation invers durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal AcM-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ und iodkatalysiert abgespalten sowie die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

**HPLC:**  $t_R = 10.31$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $\text{C}_{94}\text{H}_{133}\text{N}_{23}\text{O}_{24}\text{S}_4\text{H}_2^{2+}$  [ $M+2H^+$ ], ber.: 1049.4475, gef.: 1049.4495.

**$^1\text{H}$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ .

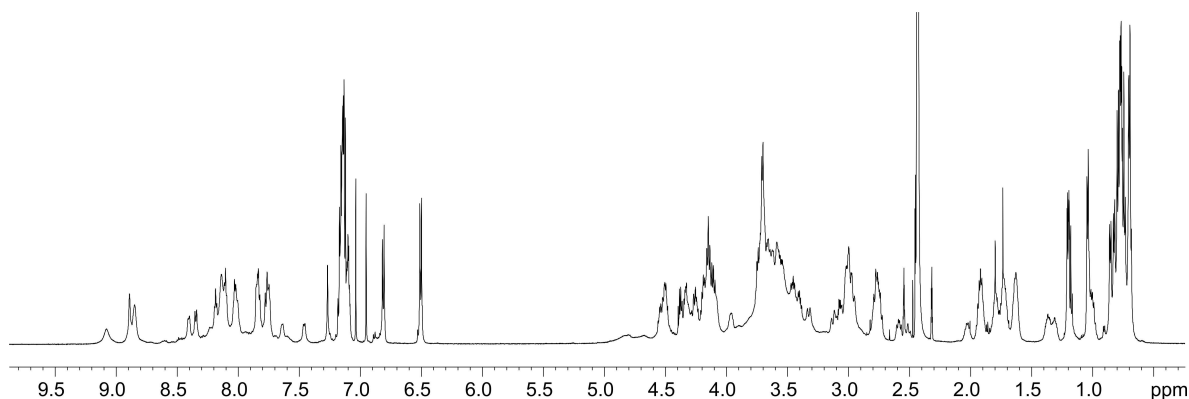


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **29** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Cys<sup>1</sup></b>	8.21	4.15	3.10, 3.19	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.92	3.67, 4.20	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.09	4.18	1.27	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.91	3.67	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	8.18	4.22	3.02, 3.39	2-H	8.96
				5-H	7.33
<b>Val<sup>6</sup></b>	7.53	4.33	2.09	Hγ	0.89, 0.92
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.25	1.82, 1.91	Hγ	1.54, 1.75
				Hδ	3.68
<b>Cys<sup>8</sup></b>	8.42	4.56	2.84, 3.08	-	
<b>Cys<sup>9</sup></b>	7.81	4.17	2.81, 3.07	-	
<b>Phe<sup>10</sup></b>	8.08	4.61	2.82, 3.05	2-6-H	7.15-7.25
<b>Val<sup>11</sup></b>	7.91	4.21	1.99	Hγ	0.85, 0.87
<b>Gly<sup>12</sup></b>	8.25	3.73, 3.80	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	7.84	4.20	1.71	Hγ	1.09, 1.33
				Hγ	0.78
				Hδ	0.74
<b>Gly<sup>14</sup></b>	8.10	3.76, 3.80	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.92	4.44	3.80	Hγ	1.11
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.28	1.83, 1.94	Hγ	1.55, 1.77
				Hδ	3.67
<b>Ile<sup>17</sup></b>	7.83	4.19	1.77	Hγ	1.10, 1.37
				Hγ	0.84
				Hδ	0.80
<b>Cys<sup>18</sup></b>	7.82	4.25	2.81, 3.07	-	
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.47	4.37	2.58, 3.02	2-6-H	7.15-7.25
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	7.71	4.31	2.65, 2.85	2,6-H	6.87
				3,5-H	6.57
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.07	3.73, 3.82	-	-	

## 6.4.30 Synthese von Peptid 30

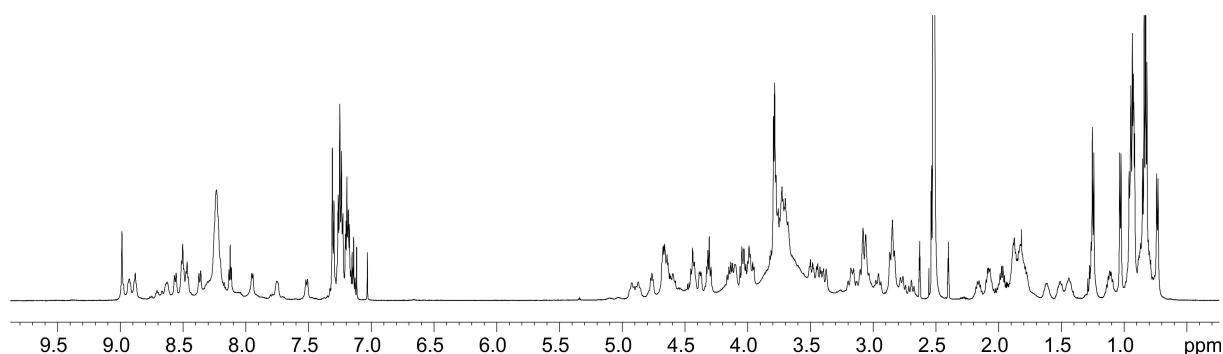
 $S^1, S^9: S^{10}, S^{18}$ -bicyclo-CGAGHVPCCFVGIGTPICFGG-OH $C_{87}H_{127}N_{23}O_{23}S_4$  [1991.35]

Das Peptid **30** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ sowie iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

**HPLC:**  $t_R = 10.43$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

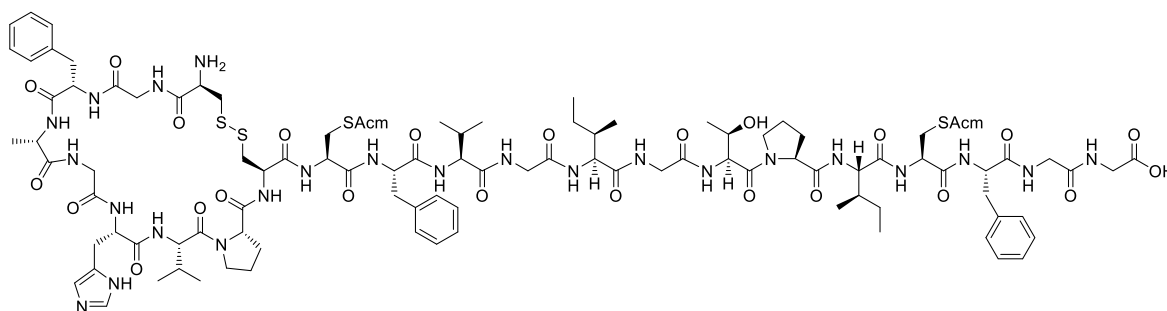
**HR-MS (ESI):** für  $C_{87}H_{127}N_{23}O_{23}S_4Na^+$   $[M+Na^+]$ , ber.: 2013.8278, gef.: 2013.8282.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO-d_6$ .





## 6.4.31 Synthese von Peptid 31

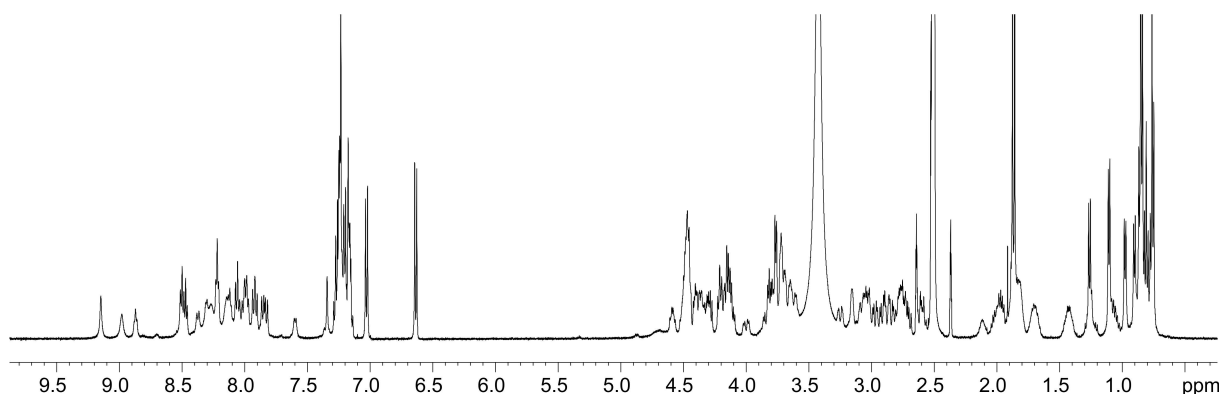
S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup>-cyclo-CGFAGHVPCC(Acm)FVGIGTPIC(Acm)FGG-OHC<sub>102</sub>H<sub>148</sub>N<sub>26</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub> [2282.70]

Das Peptid **31** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup> wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt.

**HPLC:**  $t_R = 10.36$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für C<sub>102</sub>H<sub>148</sub>N<sub>26</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub>H<sub>2</sub><sup>2+</sup> [M+2H<sup>+</sup>], ber.: 1142.0060, gef.: 1142.0043.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>.



## 6.4.32 Synthese von Peptid 32



$S^1, S^9: S^{10}, S^{18}$ -cyclo-CGFAGHVPCCFVGIGTPICFGG-OH

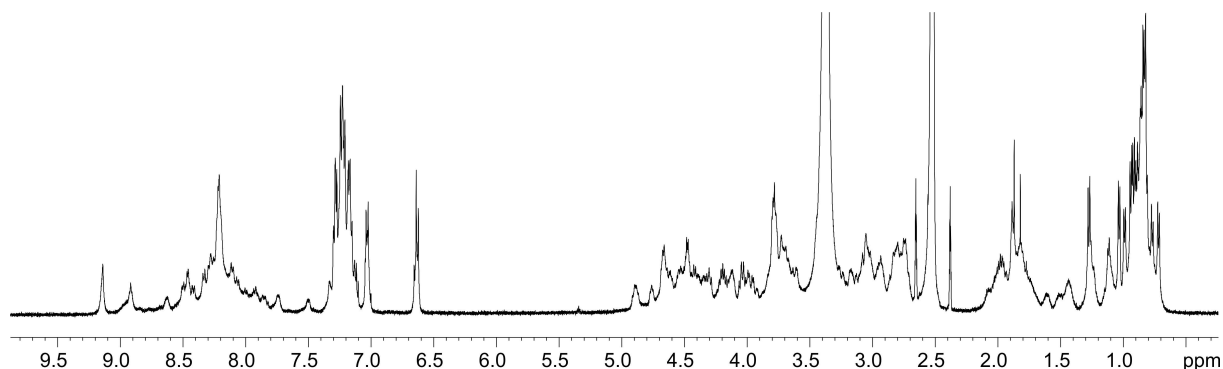
$C_{96}H_{136}N_{24}O_{24}S_4$  [2138.53]

Das Peptid **32** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acem-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ sowie iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

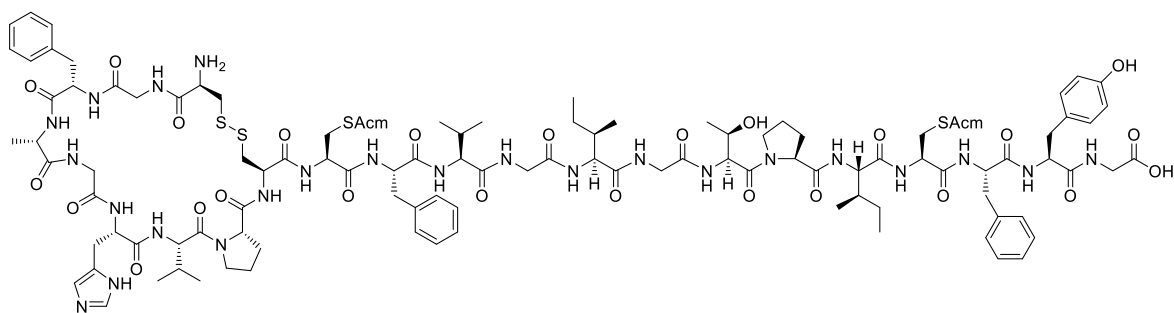
**HPLC:**  $t_R = 11.55$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{96}H_{136}N_{24}O_{25}S_4H_2^{2+}$   $[M+2H^+]$ , ber.: 1069.9611, gef.: 1069.9623.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K,  $DMSO_{d6}$ .



## 6.4.33 Synthese von Peptid 33



S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup>-cyclo-CGFAGHVPCC(Acm)FVGIGTPIC(Acm)FYG-OH

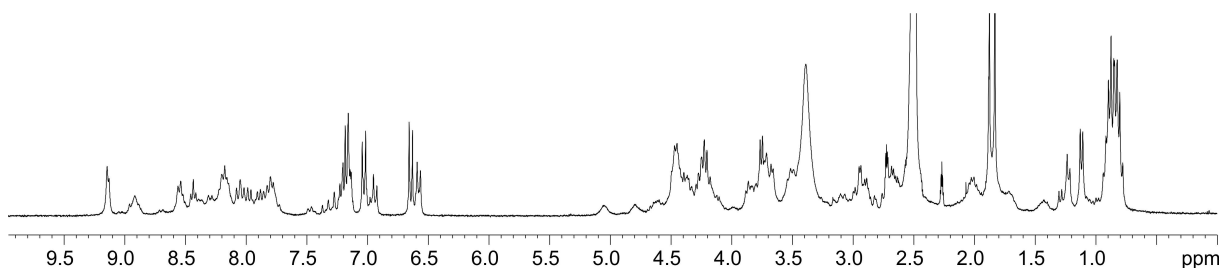
C<sub>109</sub>H<sub>154</sub>N<sub>26</sub>O<sub>27</sub>S<sub>4</sub> [2388.83]

Das Peptid **33** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid S<sup>1</sup>,S<sup>9</sup> wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während Bildung der Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt.

**HPLC:**  $t_R = 10.34$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für C<sub>109</sub>H<sub>154</sub>N<sub>26</sub>O<sub>27</sub>S<sub>4</sub>H<sub>2</sub><sup>2+</sup> [M+2H<sup>+</sup>], ber.: 1195.0269, gef.: 1195.0283.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 300 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>.



## 6.4.34 Synthese von Peptid 34

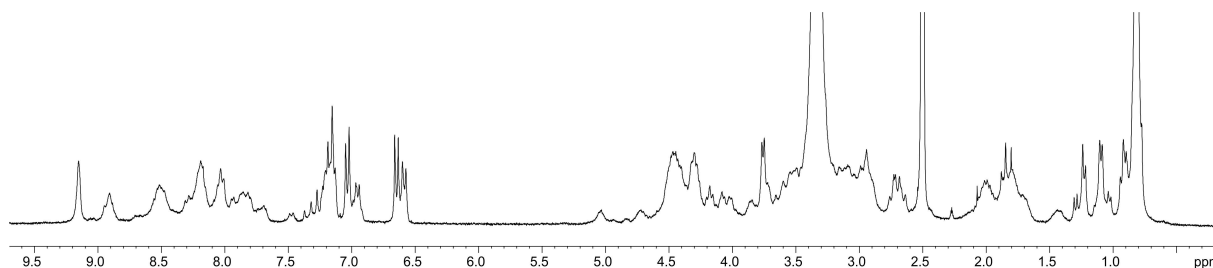
 $S^1, S^9: S^{10}, S^{18}$ -cyclo-CGFAGHVPCCFVGIGTPICFYG-OH $C_{103}H_{142}N_{24}O_{25}S_4$  [2087.39]

Das Peptid **34** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und das Disulfid  $S^1, S^9$  wurde durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Cysteine 10 und 18 waren während der Bildung der ersten Disulfidbrücke orthogonal Acm-geschützt. Die Schutzgruppen wurden oxidativ sowie iodkatalysiert abgespalten und die zweite Disulfidbrücke direkt gebildet.

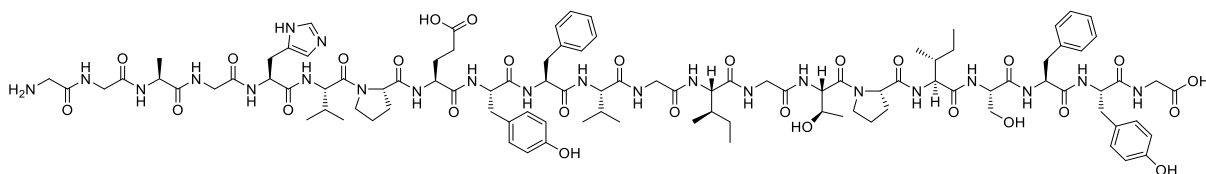
**HPLC:**  $t_R = 11.56$  min (10% - 90% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{103}H_{144}N_{24}O_{25}S_4H_2^{2+}$   $[M+2H^+]$ , ber.: 1122.9820, gef.: 112.9832.

**$^1H$ -NMR:** 300 MHz, 300 K,  $DMSO_{d6}$ .



## 6.4.35 Synthese von Peptid 35



H-GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG-OH

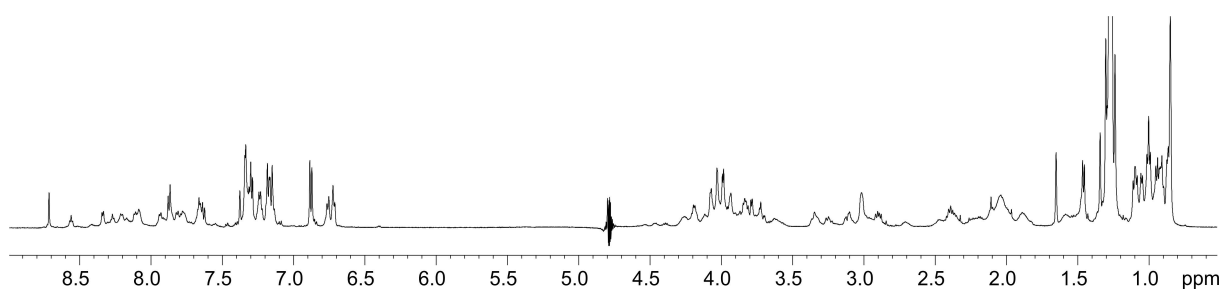
 $C_{101}H_{141}N_{23}O_{28}$  [2125.37]

Das Peptid **35** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *Apex 360 Synthesizer* in einem 0.1 mm Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung erfolgte nach 6.2.4 mit der Abspatlösung B.

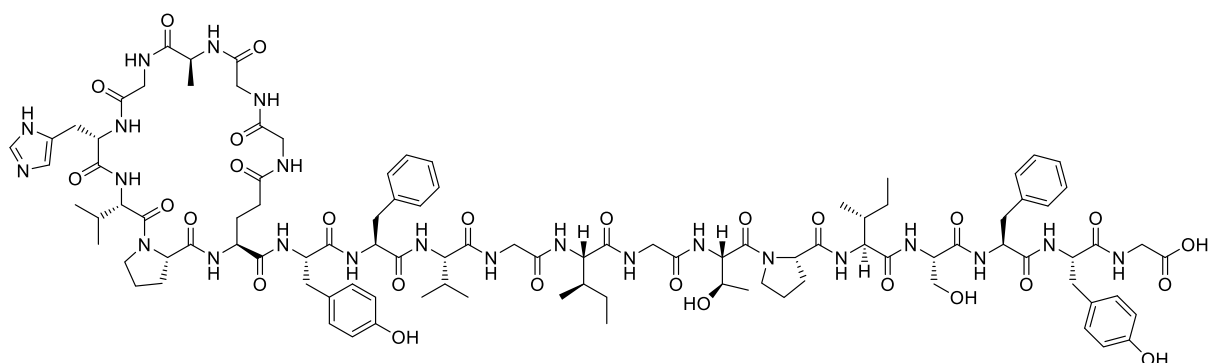
**HPLC:**  $t_R = 13.94$  min (20% - 90% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{101}H_{141}N_{23}O_{28}H_2^{2+}$   $[M+2H^+]$ , ber.: 1063.5246, gef.: 1063.5240.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.



## 6.4.36 Synthese von Peptid 36



cyclo[GGAGHVPE]YFVGIGTPISFYG-OH

$C_{101}H_{139}N_{23}O_{27}$  [2107.36]

Das Peptid **36** wurde mittels biochemischen Verfahren von der Arbeitsgruppe MARAHIEL der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG synthetisiert, stellt das native und korrekt eingefädelte Microcin J25 dar und wurde im Rahmen dieser Arbeit NMR-spektroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden Experimente zur Untersuchung der thermischen Stabilität durchgeführt.

**HPLC:**  $t_R = 13.83$  min (20% - 70% MeCN in 30 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $C_{101}H_{139}N_{23}O_{27}H_2^+$   $[M+2H^+]$ , ber.: 1054.5193, gef.: 1054.5229.

**$^1H$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/D<sub>2</sub>O 5:1.

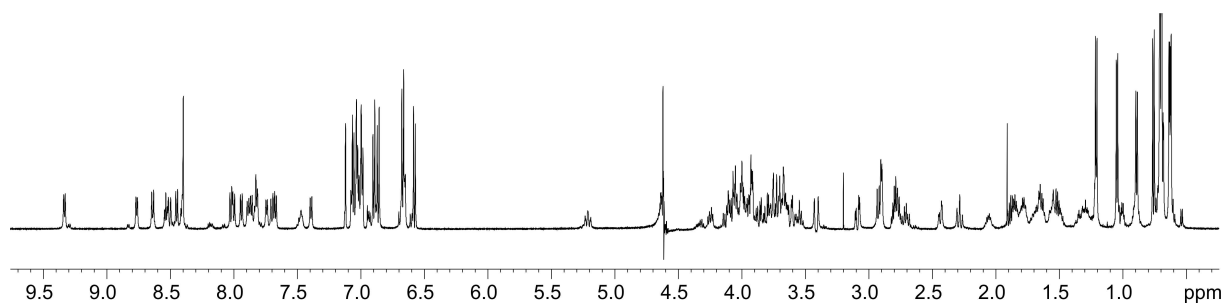


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **36** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K.

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	7.83	3.62, 4.11	-	-	
<b>Gly<sup>2</sup></b>	8.77	3.74, 4.25	-	-	
<b>Ala<sup>3</sup></b>	8.45	4.57	1.21	-	
<b>Gly<sup>4</sup></b>	8.54	3.72, 3.94	-	-	
<b>His<sup>5</sup></b>	7.70	4.35	2.91, 3.09	2-H 5-H	8.40 7.12
<b>Val<sup>6</sup></b>	8.64	4.50	1.49	Hγ	0.62, 0.89
<b>Pro<sup>7</sup></b>	-	4.09	1.62, 1.96	Hγ Hδ	1.55 3.68
<b>Glu<sup>8</sup></b>	8.00	4.52	1.30, 1.55	Hγ	1.65
<b>Tyr<sup>9</sup></b>	7.74	4.31	2.70, 2.79	2,6-H 3,5-H	6.86 6.58
<b>Phe<sup>10</sup></b>	7.89	4.53	2.78	2-6-H	6.98-7.08
<b>Val<sup>11</sup></b>	7.94	3.93	1.89	Hγ	0.70
<b>Gly<sup>12</sup></b>	7.47	3.60, 3.86	-	-	
<b>Ile<sup>13</sup></b>	7.86	4.08	1.72	Hγ Hγ Hδ	1.02, 1.45 0.86 0.75
<b>Gly<sup>14</sup></b>	7.86	3.42, 3.98	-	-	
<b>Thr<sup>15</sup></b>	7.67	4.50	3.93	Hγ	1.04
<b>Pro<sup>16</sup></b>	-	4.11	1.66, 1.95	Hγ Hδ	1.52 3.63
<b>Ile<sup>17</sup></b>	8.02	4.00	1.66	Hγ Hγ Hδ	0.89, 1.23 0.72 0.61
<b>Ser<sup>18</sup></b>	7.39	4.25	3.67, 3.76	-	
<b>Phe<sup>19</sup></b>	8.51	5.21	2.29, 2.44	2-6-H	6.98-7.08
<b>Tyr<sup>20</sup></b>	9.34	4.69	2.90	2,6-H 3,5-H	6.90 6.67
<b>Gly<sup>21</sup></b>	8.41	3.70, 3.80	-	-	

## 6.4.37 Synthese von Peptid 37



$\text{S}^4, \text{S}^{17}; \text{S}^8, \text{S}^{13}$ -bicyclo-KHQCHWECTXGRCRLVCGRSGS-OH (X = Cit)

$\text{C}_{102}\text{H}_{162}\text{N}_{40}\text{O}_{30}\text{S}_4$  [2556.90]

Das Peptid **37** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der automatisierten Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 und beide Disulfide wurden durch Luftsauerstoffoxidation erhalten. Die Bildung der entsprechenden Disulfidbrücken erfolgte regioselektiv.

**HPLC:**  $t_R = 10.17$  min (10% - 40% MeCN in 20 min, 0.42 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $\text{C}_{102}\text{H}_{162}\text{N}_{40}\text{O}_{30}\text{S}_4\text{H}_2^{2+}$   $[\text{M}+2\text{H}^+]$ , ber.: 1279.0717, gef.: 1279.0701.

**$^1\text{H}$ -NMR:** 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer (pH 3.0, 50 mM)/ $\text{D}_2\text{O}$  5:1.

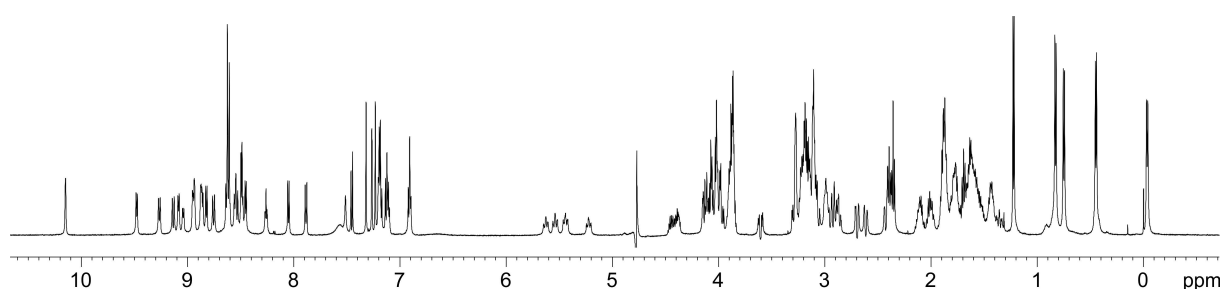
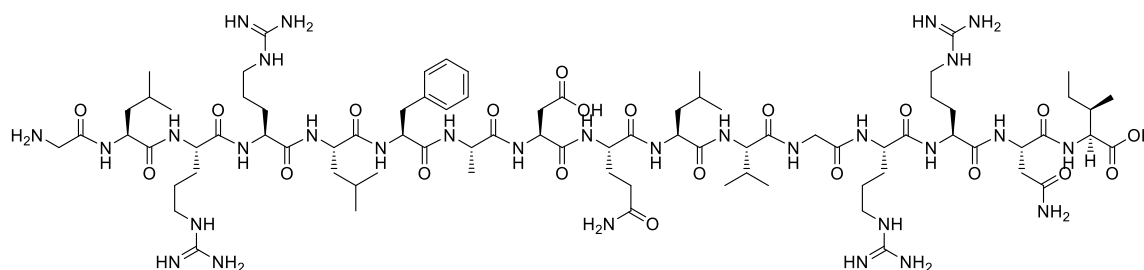




Tabelle:  $^1\text{H}$ -Chemische Verschiebungen ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ )/ppm) von Peptid **37** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K. \* = nicht zu identifizieren

Aminosäure	NH	H $\alpha$	H $\beta$	weitere	
<b>Lys</b> <sup>1</sup>	*	4.77	1.70, 1.89	H $\gamma$	1.43
				H $\delta$	1.70
				H $\epsilon$	3.00
<b>His</b> <sup>2</sup>	9.04	4.80	3.17, 3.30	2-H	8.62
				5-H	7.32
<b>Gln</b> <sup>3</sup>	8.82	4.43	2.01, 2.10	H $\gamma$	2.37
<b>Cys</b> <sup>4</sup>	8.53	5.45	2.44, 3.08	-	
<b>His</b> <sup>5</sup>	8.87	5.23	2.90	2-H	8.61
				5-H	7.23
<b>Trp</b> <sup>6</sup>	9.08	4.89	3.11	2-H	7.27
				4-H	6.92
				5-H	7.13
				6-H	7.19
				7-H	7.45
<b>Glu</b> <sup>7</sup>	9.27	4.83	1.88, 2.12	H $\gamma$	2.39
<b>Cys</b> <sup>8</sup>	9.13	5.54	2.70, 3.11	-	
<b>Thr</b> <sup>9</sup>	8.63	4.45	4.07	H $\gamma$	1.23
<b>Cit</b> <sup>10</sup>	9.48	3.89	1.81, 2.01	H $\gamma$	1.56
				H $\delta$	3.14
<b>Gly</b> <sup>11</sup>	8.49	4.00	-	-	
<b>Arg</b> <sup>12</sup>	8.94	4.68	1.45, 1.62	H $\gamma$	1.78
				H $\delta$	3.12
<b>Cys</b> <sup>13</sup>	8.95	5.63	2.62, 2.94	-	
<b>Arg</b> <sup>14</sup>	7.88	4.69	1.55, 1.65	H $\gamma$	1.88
				H $\delta$	3.23
<b>Leu</b> <sup>15</sup>	8.55	3.91	1.36	H $\gamma$	0.85
				H $\delta$	-0.03, 0.44
<b>Val</b> <sup>16</sup>	8.75	4.14	1.60	H $\gamma$	0.75, 0.83
<b>Cys</b> <sup>17</sup>	8.86	5.22	2.89	-	
<b>Gly</b> <sup>18</sup>	8.26	4.00, 4.08	-	-	
<b>Arg</b> <sup>19</sup>	8.45	4.40	1.77, 1.87	H $\gamma$	1.63
				H $\delta$	3.20
<b>Ser</b> <sup>20</sup>	8.49	4.46	3.87	-	
<b>Gly</b> <sup>21</sup>	*	*	-	-	
<b>Ser</b> <sup>22</sup>	8.05	4.38	3.88	-	

## 6.4.38 Synthese von Peptid 38



H-GLRRLFADQLVGRRI-OH

 $\text{C}_{82}\text{H}_{142}\text{N}_{30}\text{O}_{21}$  [1884.23]

Das Peptid **38** wurde nach der allgemeinen Vorschrift der Festphasenpeptidsynthese 6.2.5 automatisiert an einem *LibertyBlue* von CEM auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.1 mM Maßstab synthetisiert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 6.2.4 mit der Abspatlösung B für 2 h.

**HPLC:**  $t_R = 14.42$  min (10% - 60% MeCN in 25 min, 0.32 mL/min).

**HR-MS (ESI):** für  $\text{C}_{82}\text{H}_{142}\text{N}_{30}\text{O}_{21}\text{H}_2^{2+}$  [ $\text{M}+2\text{H}^+$ ], ber.: 942.5556, gef.: 942.5459.

**$^1\text{H}$ -NMR:** 500 MHz, 300 K,  $\text{DMSO-d}_6$ .

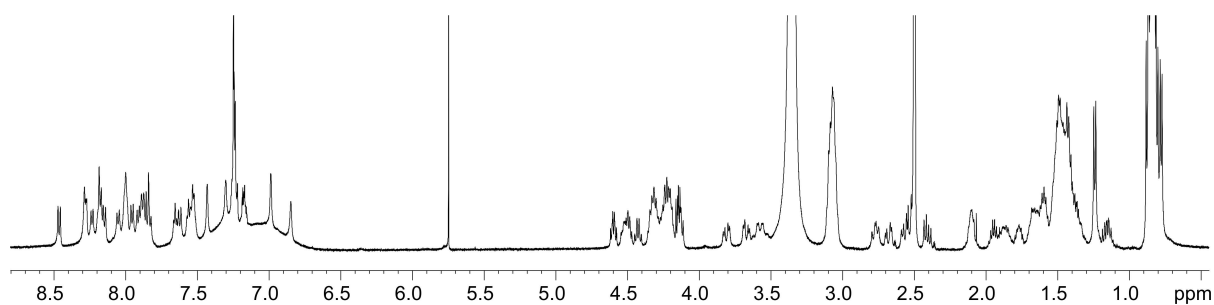


Tabelle: <sup>1</sup>H-Chemische Verschiebungen (δ (<sup>1</sup>H)/ppm) von Peptid **38** aus TOCSY-/HSQC-Spektren, 300 K.

Aminosäure	NH	Hα	Hβ	weitere	
<b>Gly<sup>1</sup></b>	7.99	3.57	-	-	
<b>Leu<sup>2</sup></b>	8.46	4.43	1.42, 1.60	Hγ	1.44
				Hδ	0.87
<b>Arg<sup>3</sup></b>	8.28	4.21	1.49, 1.64	Hγ	1.24
				Hδ	3.06
<b>Arg<sup>4</sup></b>	7.66	4.23	1.48, 1.65	Hγ	1.44
				Hδ	3.08
<b>Leu<sup>5</sup></b>	7.86	4.19	1.40, 1.61	Hγ	1.36
				Hδ	0.83
<b>Phe<sup>6</sup></b>	8.05	4.52	2.77, 3.08	2-6-H	7.17-7.26
<b>Ala<sup>7</sup></b>	8.29	4.22	1.24	-	
<b>Asp<sup>8</sup></b>	8.23	4.49	2.57, 2.68	-	
<b>Gln<sup>9</sup></b>	7.83	4.17	1.86	Hγ	2.10
<b>Leu<sup>10</sup></b>	7.88	4.31	1.48, 1.57	Hγ	1.36
				Hδ	0.82
<b>Val<sup>11</sup></b>	7.62	4.13	1.95	Hγ	0.85
<b>Gly<sup>12</sup></b>	8.19	3.67, 3.80	-	-	
<b>Arg<sup>13</sup></b>	7.96	4.33	1.48, 1.67	Hγ	1.48
				Hδ	3.08
<b>Arg<sup>14</sup></b>	8.15	4.30	1.51, 1.68	Hγ	1.49
				Hδ	3.07
<b>Asn<sup>15</sup></b>	8.17	4.60	2.41, 2.53	-	
<b>Ile<sup>16</sup></b>	7.85	4.14	1.77	Hγ	1.16, 1.37
				Hδ	0.83

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] L. Euler, *Comment. Acad. Sci. U. Petrop.* **1735**, *8*, 128–140.
- [2] M. Schubert, in *Mathematik für Informatiker*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2012**, pp. 363–404.
- [3] K. P. Müller, H. Wölpert, *Anschauliche Topologie*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **1976**, pp.40–68.
- [4] J. P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 319–327.
- [5] C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, J. P. Kintzinger, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5095–5098.
- [6] <http://www.dfb.de/verbandsstruktur/logo/>, **2016**, 03.04.2016
- [7] C. Liang, K. Mislow, *J. Math. Chem.* **1994**, *15*, 245–260.
- [8] C. Liang, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4201–4213.
- [9] E. Flapan, *When Topology Meets Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, **2000**, pp. 32–107.
- [10] H. L. Frisch, E. Wasserman, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3789–3795.
- [11] O. Lukin, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1480–1501; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1456–1477.
- [12] J. C. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 635–692.
- [13] J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 430–440.
- [14] J. D. Griffith, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 3124–3128.
- [15] S. A. Wasserman, N. R. Cozzarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 1079–1083.
- [16] D. Marenduzzo, E. Orlandini, A. Stasiak, D. W. Sumners, L. Tubiana, C. Micheletti, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 22269–22274.
- [17] I. K. Darcy, M. Vazquez, *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 601–605.
- [18] R. M. Epand, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1999**, *1462*, 11–28.
- [19] K. R. Gustafson, R. C. Sowder, L. E. Henderson, I. C. Parsons, Y. Kashman, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, R. W. Buckheit, L. K. Pannell, M. R. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9337–9338.
- [20] K. Roth, *Chem. unserer Zeit* **2005**, *39*, 212–217.
- [21] M. Miyazato, M. Nakazato, H. Yamaguchi, Y. Date, M. Kojima, K. Kangawa, H. Matsuo, S. Matsukura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 644–648.
- [22] M. Miyazato, M. Nakazato, S. Matsukura, K. Kangawa, H. Matsuo, *Genomics* **1997**, *43*, 359–365.
- [23] a) A. Schulz, S. Escher, U. C. Marx, M. Meyer, P. Rösch, W.-G. Forssmann, K. Adermann, *J. Pept. Res.* **2009**, *52*, 518–525, b) K. Adermann, K. Barlos, *Oxidative Folding of Peptides*

- and Proteins*, RSC Biomolecular Sciences, Cambridge, **2009**, p. 305.
- [24] G. Schill, *Catenanes, Rotaxanes and Knots*, Academic Press, New York, **1971**, pp. 7–11.
- [25] O. Safarowsky, B. Windisch, A. Mohry, F. Vögtle, *J. Prakt. Chemie* **2000**, *342*, 437–444.
- [26] I. Schomburg, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4719–4738.
- [27] F. Vögtle, A. Hüntel, E. Vogel, S. Buschbeck, O. Safarowsky, J. Recker, A. Parham, M. Knott, W. M. Müller, U. Müller, et al., *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2534–2537; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2468–2471.
- [28] A. Blond, M. Cheminant, D. Destoumieux-Garzón, I. Ségalas-Milazzo, J. Peduzzi, C. Goulard, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 6212–6222.
- [29] S. A. Wasserman, N. R. Cozzarelli, *Science* **1986**, *232*, 951–960.
- [30] S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 469–475.
- [31] R. Cacciapaglia, L. Mandolins, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 221–231.
- [32] R. Hoss, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 389–398; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 375–384.
- [33] L. M. Greig, D. Philp, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 287–302.
- [34] J. K. M. Sanders, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2265–2274.
- [35] V. I. Sokolov, *Russ. Chem. Rev.* **1973**, *42*, 452–463.
- [36] R. S. Forgan, J. P. Sauvage, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5434–5464.
- [37] J. Guo, P. C. Mayers, G. A. Breault, C. A. Hunter, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 218–222.
- [38] C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 192–194; *Angew. Chemie Int. Ed.* **1989**, *28*, 189–192.
- [39] D. M. Walba, R. M. Richards, R. C. Haltiwanger, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3219–3221.
- [40] C. D. Pentecost, K. S. Chichak, A. J. Peters, G. W. V. Cave, S. J. Cantrill, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 222–226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *46*, 218–222.
- [41] D. A. Leigh, R. G. Pritchard, A. J. Stephens, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 978–982.
- [42] M. Feigel, R. Ladberg, S. Engels, R. Herbst-Irmer, R. Fröhlich, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 5827–5831; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5698–5702.
- [43] M. E. Belowich, J. F. Stoddart, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- [44] G. Koshkakarayan, D. Cao, L. M. Klivansky, S. J. Teat, J. L. Tran, Y. Liu, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1528–1531.
- [45] S. Feil, *Chem. unserer Zeit* **2015**, *49*, 154–154.
- [46] A. Essig, D. Hofmann, D. Münch, S. Gayathri, M. Künzler, P. T. Kallio, H.-G. Sahl, G. Wider, T. Schneider, M. Aebi, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34953–34964.
- [47] R. Soudy, L. Wang, K. Kaur, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1794–1800.
- [48] R. Hammami, F. Bédard, A. Gomaa, M. Subirade, E. Biron, I. Fliss, *Amino Acids* **2015**, *47*, 417–428.

- [49] A. L. Ferguson, S. Zhang, I. Dikiy, A. Z. Panagiotopoulos, P. G. Debenedetti, A. J. Link, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3056–3065.
- [50] K. Wüthrich, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 923–925.
- [51] M. Ohnishi, D. W. Urry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *36*, 194–202.
- [52] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chemie Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
- [53] H. Kessler, J. W. Bats, K. Wagner, M. Will, *Biopolymers* **1989**, *28*, 385–395.
- [54] A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 575–583.
- [55] N. H. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547–8561.
- [56] K. J. Dit Fouque, C. Afonso, S. Zirah, J. D. Hegemann, M. Zimmermann, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, H. Lavanant, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1166–1172.
- [57] D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10141–10142.
- [58] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S.-J. Hyung, C. V. Robinson, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1139–1152.
- [59] S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J. Shea, G. Bitan, D. B. Teplow, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2075–2084.
- [60] R. O. Dror, R. M. Dirks, J. P. Grossman, H. Xu, D. E. Shaw, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 429–452.
- [61] Editorial, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 351–351.
- [62] J. R. Hanson, in *Natural Products* (Ed.: J.R. Hanson), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2003**, pp. 1–34.
- [63] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–477.
- [64] A. Fleming, *J. Am. Inst. Homeopath.* **1946**, *39*, 154–157.
- [65] D. Tedesco, L. Haragsim, *J. Transplant.* **2012**, *2012*, 1–7.
- [66] R. A. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597–1598.
- [67] R. a Holton, H. B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1599–1600.
- [68] J. Liebmann, J. Cook, C. Lipschultz, D. Teague, J. Fisher, J. Mitchell, *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 1104–1109.
- [69] S. Culine, I. Roch, F. Pinguet, G. Romieu, F. Bressolle, *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 1999–2005
- [70] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, *Metabolites* **2012**, *2*, 303–336.
- [71] M. Lahlou, *Pharmacology & Pharmacy* **2013**, *04*, 17–31.
- [72] A. L. Harvey, R. Edrada-Ebel, R. J. Quinn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 111–129.
- [73] H. Lévesque, O. Lafont, *La Revue Médecine Interne* **2000**, *21*, 8–17.

- [74] J. G. Mahdi, A. J. Mahdi, A. J. Mahdi, I. D. Bowen, *Cell Prolif.* **2006**, *39*, 147–155.
- [75] WHO, "Liste der unentbehrlichen Arzneimittel," <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>, **2016**, 03.04.2016.
- [76] L. Silver, K. Bostian, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1990**, *9*, 455–461.
- [77] S. Rachakonda, L. Cartee, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 775–793.
- [78] M. R. Barbachyn, C. W. Ford, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2056–2144; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2010–2023.
- [79] S. B. Levy, B. Marshall, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 122–129.
- [80] C. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775–81.
- [81] J. Davies, D. Davies, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433.
- [82] K. Fosgerau, T. Hoffmann, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122–128.
- [83] L. Otvos, J. D. Wade, *Front. Chem.* **2014**, *2*, 8–11.
- [84] Y. Lu, J. Yang, E. Sega, *The AAPS J.* **2006**, *8*, 466–478.
- [85] C. Adessi, C. Soto, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 963–978.
- [86] J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292–296.
- [87] V. J. Hruby, *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 165–167.
- [88] Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin, P. Dumy, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298–1314.
- [89] H. M. Werner, C. C. Cabalteja, W. S. Horne, *ChemBioChem* **2015**, DOI: 10.1002/cbic.201500312
- [90] I. Avan, C. D. Hall, A. R. Katritzky, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3575.
- [91] L.-K. An, R.-L. Li, Y.-L. Zuo, L.-Q. Gu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 34–37.
- [92] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, Heidelberg, **2013**, pp. 899–932.
- [93] A. McLennan, A. Bates, P. Turner, M. White, *Molekularbiologie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, Germany, **2013**, pp. 95–149.
- [94] G. C. Scheper, M. S. van der Knaap, C. G. Proud, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 711–723.
- [95] S. Zalik, B. L. Jones, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1973**, *24*, 47–68.
- [96] W. Müller-Esterl, *Biochemie*, Springer Spektrum, Heidelberg, **2011**, pp. 193–255.
- [97] G. Schreiber, *Angew. Chem.* **1971**, *83*, 645–658; *Angew. Chemie Int. Ed.* **1971**, *10*, 638–651.
- [98] R. E. W. Hancock, D. S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317–1323.
- [99] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [100] M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–240.
- [101] J. S. Davis, C. L. Satorius, N. D. Epstein, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 359–370.
- [102] F. Kopp, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 735–749.
- [103] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.
- [104] M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651–2674.

- [105] J. H. Crosa, C. T. Walsh, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- [106] Datenbank, “Norine” <http://bioinfo.lifl.fr/norine/>, **2016**, 03.04.2016.
- [107] S. Caboche, M. Pupin, V. Leclere, A. Fontaine, P. Jacques, G. Kuchеров, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, 326–331.
- [108] T. J. Oman, W. A. van der Donk, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 9–18.
- [109] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, et al., *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108–160.
- [110] X. Yang, W. A. van der Donk, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7662–7677.
- [111] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7508–7539; *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372.
- [112] J. M. Willey, W. a van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [113] G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 2–18.
- [114] G. Jung, *Angew. Chemie* **1991**, *103*, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1051–1068.
- [115] C. T. Walsh, *Posttranslational Modification of Proteins*, Robert & Company Publishers, Colorado (USA), **2006**, pp. 35–461.
- [116] G. Walsh, R. Jefferis, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1241–1252.
- [117] R. G. Krishna, F. Wold, in *Methods Protein Sequence Analysis*, Springer US, Boston (USA), **1993**, pp. 167–172.
- [118] L. Beevers, in *Nucleic Acids Proteins Plants I*, Springer Spektrum, Heidelberg, **1982**, pp. 136–168.
- [119] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649.
- [120] G. Bierbaum, A. Jansen, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 734–735.
- [121] Y. Li, S. Zirah, S. Rebuffat, *Lasso Peptides*, Springer New York, New York, **2015**, p. 82.
- [122] M. O. Maksimov, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12038–12047.
- [123] T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11446–11454.
- [124] M. O. Maksimov, S. J. Pan, A. J. Link, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 996.
- [125] B. Weber, W. Fischli, E. Hochuli, E. Kupfer, E. K. Weibel, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 164–171.
- [126] D. Frechet, J. D. Guitton, F. Herman, D. Faucher, G. Helynck, B. Monegier du Sorbier, J. P. Ridoux, E. James-Surcouf, M. Vuilhorgne, *Biochemistry* **1994**, *33*, 42–50.
- [127] A. Blond, J. Péduzzi, C. Goulard, M. J. Chiuchiolo, M. Barthélémy, Y. Prigent, R. A. Salomón, R. N. Farías, F. Moreno, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *259*, 747–756.
- [128] A. Blond, M. Cheminant, I. Ségalas-Milazzo, J. Péduzzi, M. Barthélémy, C. Goulard, R. Salomón, F. Moreno, R. Farías, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2124–2133.
- [129] K. J. Rosengren, R. J. Clark, N. L. Daly, U. Göransson, A. Jones, D. J. Craik, *J. Am. Chem. Soc.*



- 2003, 125, 12464–12474.
- [130] K.-A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov, S. A. Darst, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12475–12483.
- [131] S. Rebuffat, A. Blond, D. Destoumieux-Garzon, C. Goulard, J. Peduzzi, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, 5, 383–391.
- [132] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 210–222.
- [133] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, S. Zhu, D. Klug, M. A. Marahiel, *Biopolymers* **2013**, 100, 527–542.
- [134] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, S. Zhu, H. Steuber, K. Harms, X. Xie, M. A. Marahiel, *Angew. Chemie* **2014**, 126, 2262–2266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 2230–2234.
- [135] M. Zimmermann, J. D. Hegemann, X. Xie, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2013**, 20, 558–569.
- [136] M. O. Maksimov, I. Pelczer, A. J. Link, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 15223–15228.
- [137] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzon, S. Zirah, C. Goulard, J. Peduzzi, S. Rebuffat, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 793–803.
- [138] T. A. Knappe, U. Linne, L. Robbel, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 1290–1298.
- [139] K.-P. Yan, Y. Li, S. Zirah, C. Goulard, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1046–1052.
- [140] S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, 40, 1456–1462.
- [141] O. Pavlova, J. Mukhopadhyay, E. Sineva, R. H. Ebright, K. Severinov, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 25589–25595.
- [142] S. J. Pan, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5016–5023.
- [143] R. Ducasse, K.-P. Yan, C. Goulard, A. Blond, Y. Li, E. Lescop, E. Guittet, S. Rebuffat, S. Zirah, *ChemBioChem* **2012**, 13, 371–380.
- [144] T. A. Knappe, F. Manzenrieder, C. Mas-Moruno, U. Linne, F. Sasse, H. Kessler, X. Xie, M. A. Marahiel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, 50, 8714–8717.
- [145] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, X. Xie, M. A. Marahiel, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1909–1919.
- [146] K. Severinov, E. Semenova, A. Kazakov, T. Kazakov, M. S. Gelfand, *Mol. Microbiol.* **2007**, 65, 1380–1394.
- [147] O. Potterat, H. Stephan, J. W. Metzger, V. Gnau, H. Zähler, G. Jung, *Liebigs Ann. der Chemie* **1994**, 1994, 741–743.
- [148] K. Yano, S. Toki, S. Nakanishi, K. Ochiai, K. Ando, M. Yoshida, Y. Matsuda, M. Yamasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 115–120.
- [149] R. Katahira, M. Yamasaki, Y. Matsuda, M. Yoshida, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 121–129.
- [150] K. Constantine, M. Friedrichs, D. Detlefsen, M. Nishio, M. Tsunakawa, T. Furumai, H.

- Ohkuma, T. Oki, S. Hill, R. Bruccoleri, et al., *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 271–286.
- [151] R. D. Kersten, Y.-L. Yang, Y. Xu, P. Cimermancic, S.-J. Nam, W. Fenical, M. A. Fischbach, B. S. Moore, P. C. Dorrestein, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 794–802.
- [152] Y. Li, R. Ducasse, S. Zirah, A. Blond, C. Goulard, E. Lescop, C. Giraud, A. Hartke, E. Guittet, J.-L. Pernodet, et al., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2641–2649.
- [153] D. F. Wyss, H.-W. Lahm, M. Manneberg, A. M. Labhardt, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 172–180.
- [154] M. Iwatsuki, R. Uchida, Y. Takakusagi, A. Matsumoto, C.-L. Jiang, Y. Takahashi, M. Arai, S. Kobayashi, M. Matsumoto, J. Inokoshi, et al., *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 357–63.
- [155] M. Iwatsuki, H. Tomoda, R. Uchida, H. Gouda, S. Hirono, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7486–7491.
- [156] K. Kimura, F. Kanou, H. Takahashi, Y. Esumi, M. Uramoto, M. Yoshihama, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 373–378.
- [157] K. Kimura, M. Yamazaki, N. Sasaki, T. Yamashita, S. Negishi, T. Nakamura, H. Koshino, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 519–523.
- [158] Y. Morishita, S. Chiba, E. Tsukuda, T. Tanaka, T. Ogawa, M. Yamasaki, M. Yoshida, I. Kawamoto, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 269–275.
- [159] R. Katahira, K. Shibata, M. Yamasaki, Y. Matsuda, M. Yoshida, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1273–1280.
- [160] T. Ogawa, K. Ochiai, T. Tanaka, E. Tsukuda, S. Chiba, K. Yano, M. Yamasaki, M. Yoshida, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1213–1220.
- [161] S. Um, Y.-J. Kim, H. Kwon, H. Wen, S.-H. Kim, H. C. Kwon, S. Park, J. Shin, D.-C. Oh, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 873–879.
- [162] J. D. Hegemann, C. D. Fage, S. Zhu, K. Harms, F. S. Di Leva, E. Novellino, L. Marinelli, M. A. Marahiel, *Mol. BioSyst.* **2016**, *12*, 1106–1109.
- [163] R. A. Salomon, R. N. Farias, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3323–3325.
- [164] K. J. Rosengren, A. Blond, C. Afonso, J.-C. Tabet, S. Rebuffat, D. J. Craik, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4696–4702.
- [165] T. A. Knappe, U. Linne, X. Xie, M. A. Marahiel, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 785–789.
- [166] H. Nar, A. Schmid, C. Puder, O. Potterat, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1689–1692.
- [167] X. Xie, M. A. Marahiel, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 621–625.
- [168] I. Mathavan, S. Zirah, S. Mehmood, H. G. Choudhury, C. Goulard, Y. Li, C. V Robinson, S. Rebuffat, K. Beis, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 340–342.
- [169] S. Zirah, C. Afonso, U. Linne, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, J.-C. Tabet, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 467–479.
- [170] D. J. Clarke, D. J. Campopiano, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2564.
- [171] V. C. Yee, L. C. Pedersen, I. Le Trong, P. D. Bishop, R. E. Stenkamp, D. C. Teller, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* **1994**, *91*, 7296–7300.
- [172] T. M. Larsen, S. K. Boehlein, S. M. Schuster, N. G. J. Richards, J. B. Thoden, H. M. Holden, I. Rayment, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16146–16157.
- [173] S. J. Pan, J. Rajniak, W. L. Cheung, A. J. Link, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 367–370.
- [174] J. Inokoshi, M. Matsuhama, M. Miyake, H. Ikeda, H. Tomoda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 451–460.
- [175] W. J. K. Crone, F. J. Leeper, A. W. Truman, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3516–3521.
- [176] J. P. Gomez-Escribano, L. Song, M. J. Bibb, G. L. Challis, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3522–3525.
- [177] L. Huo, S. Rachid, M. Stadler, S. C. Wenzel, R. Müller, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1278–1287.
- [178] C.-J. Tsai, B. Ma, R. Nussinov, *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 013001.
- [179] W. L. Cheung, S. J. Pan, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2514–2515.
- [180] M. J. Chiuchiolo, M. A. Delgado, R. N. Farias, R. A. Salomon, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1755–1764.
- [181] R. A. Salomon, R. N. Fariás, *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *121*, 275–279.
- [182] Y. Li, S. Zirah, S. Rebuffat, *Lasso Peptides*, Springer New York, New York, **2015**, pp. 37–64.
- [183] D. J. Detlefsen, S. E. Hill, K. J. Volk, S. E. Klotz, M. Tsunakawa, T. Furumai, P. F. Lin, M. Nishio, K. Kawano, T. Oki, et al., *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1515–1517.
- [184] M. Tsunakawa, S.-L. Hu, Y. Hoshino, D. J. Detlefsen, S. E. Hill, T. Furumai, R. J. White, M. Nishio, K. Kawano, S. Yamamoto, et al., *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 433–434.
- [185] G. Helynck, C. Dubertret, J. F. Mayaux, J. Le Boul, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1756–1757.
- [186] R. Ducasse, Y. Li, A. Blond, S. Zirah, E. Lescop, C. Goulard, E. Guittet, J.-L. Pernodet, S. Rebuffat, *J. Pept. Sci.* **2012**, 67–68.
- [187] K. Kimura, F. Kanou, H. Takahashi, Y. Esumi, M. Uramoto, M. Yoshihama, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 37337–37338.
- [188] O. Potterat, K. Wagner, G. Gemmecker, J. Mack, C. Puder, R. Vettermann, R. Streicher, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1528–1531.
- [189] T. Tanaka, E. Tsukuda, M. Nozawa, H. Nonaka, T. Ohno, H. Kase, K. Yamada, Y. Matsuda, *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 724–730.
- [190] T. Ogawa, K. Ochiai, T. Tanaka, E. Tsukuda, S. Chiba, K. Yano, M. Yamasaki, M. Yoshida, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1213–1220.
- [191] R. A. Salomón, R. N. Farías, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7428–7435.
- [192] M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. T. Swapna, J. Y. Huang, L.-C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382–12383.
- [193] P. Vincent, R. Morero, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 538–549.
- [194] R. A. Salomón, R. N. Farías, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7741–7742.
- [195] V. Braun, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3431–3436.

- [196] A. Bellomio, P. A. Vincent, B. F. de Arcuri, R. A. Salomón, R. D. Morero, R. N. Farías, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 1454–1458.
- [197] A. Bellomio, P. A. Vincent, B. F. de Arcuri, R. N. Farias, R. D. Morero, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 4180–4186.
- [198] P. A. Vincent, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *236*, 103–107.
- [199] S. B. Socias, K. Severinov, R. A. Salomon, *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *301*, 124–129.
- [200] N. Corbalan, G. Runti, C. Adler, S. Covaceuszach, R. C. Ford, D. Lamba, K. Beis, M. Scocchi, P. A. Vincent, *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 5352–5361.
- [201] K. Adelman, J. Yuzenkova, A. La Porta, N. Zenkin, J. Lee, J. T. Lis, S. Borukhov, M. D. Wang, K. Severinov, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 753–762.
- [202] P. A. Vincent, A. Bellomio, B. F. de Arcuri, R. N. Farías, R. D. Morero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 549–551.
- [203] M. C. Chalon, A. Bellomio, J. O. Solbiati, R. D. Morero, R. N. Farías, P. A. Vincent, *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *300*, 90–96.
- [204] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [205] A. Moulin, J. Martinez, J.-A. Fehrentz, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 1–15.
- [206] J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899.
- [207] J. P. Tam, C. Rao, C.-F. Liu, J. Shao, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *45*, 209–216.
- [208] L. E. Canne, A. R. Ferre-D'Amare, S. K. Burley, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998–3007.
- [209] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33.
- [210] T. Aoyagi, T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 283–286.
- [211] A. Basak, F. Jean, N. G. Seidah, C. Lazure, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 253–261.
- [212] E. Sarubbi, P. F. Seneci, M. R. Angelastro, N. P. Peet, M. Denaro, K. Islam, *FEBS Lett.* **1993**, *319*, 253–256.
- [213] J.-A. Fehrentz, A. Heitz, B. Castro, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *26*, 236–241.
- [214] C. Ganneau, A. Moulin, L. Demange, J. Martinez, J.-A. Fehrentz, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 497–501.
- [215] E. D. Stroud, D. J. Fife, G. G. Smith, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5368–5369.
- [216] Y. Hamada, T. Shiori, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1921–1924.
- [217] G. Sorg, B. Thern, O. Mader, J. Rademann, G. Jung, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 142–152.
- [218] G. Guichard, J.-P. Briand, M. Friede, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 121–124.
- [219] J.-A. Fehrentz, M. Paris, A. Heitz, J. Velek, C.-F. Liu, F. Winternitz, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7871–7874.
- [220] C. Douat, A. Heitz, J. Martinez, J.-A. Fehrentz, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 37–40.

- [221] W. D. Fuller, M. P. Cohen, M. Shabankareh, R. K. Blair, M. Goodman, F. R. Naider, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7414–7416.
- [222] C. B. Xue, F. Naider, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 350–355.
- [223] J.-A. Fehrentz, J.-C. Califano, M. Amblard, A. Loffet, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 569–571.
- [224] P. Zlatoidsky, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 150–154.
- [225] N. Galeotti, M. Giraud, P. Jouin, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 437–440.
- [226] A. M. Murphy, R. Dagnino, P. L. Vallar, A. J. Trippe, S. L. Sherman, R. H. Lumpkin, S. Y. Tamura, T. R. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3156–3157.
- [227] R. Dagnino, T. R. Webb, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2125–2128.
- [228] N. J. Ede, A. M. Bray, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7119–7122.
- [229] C. Gros, C. Boulègue, N. Galeotti, G. Niel, P. Jouin, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2673–2680.
- [230] K. J. Jensen, J. Alsina, M. F. Songster, J. Vágner, F. Albericio, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452.
- [231] J. A. Lloyd, J. M. Spraggins, M. V Johnston, J. Laskin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1289–1298.
- [232] C. Pothion, M. Paris, A. Heitz, L. Rocheblave, F. Rouch, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7749–7752.
- [233] M. Paris, A. Heitz, V. Guerlavais, M. Cristau, J. Fehrentz, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7287–7290.
- [234] S. Enck, *Synthesis and Analytics of Rigidified Peptide Architectures*, Philipps-Universität Marburg, **2010**.
- [235] J. Rush, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 131–134.
- [236] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455–2463.
- [237] L. L. Lao, J.-L. Schmitt, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4903–4910.
- [238] A. Petitjean, L. A. Cuccia, M. Schmutz, J.-M. Lehn, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2481–2495.
- [239] S. Enck, F. Kopp, M. A. Marahiel, A. Geyer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2597–2601.
- [240] F. Kopp, C. Mahlert, J. Grünwald, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16478–16479.
- [241] S. Enck, F. Kopp, M. A. Marahiel, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 559–563.
- [242] O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon, A. Hoffman, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 479–487.
- [243] D. F. Veber, R. M. Freidinger, D. S. Perlow, W. J. Paleveda, F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, et al., *Nature* **1981**, *292*, 55–58.
- [244] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, A. Kling, M. Kottenhahn, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7550–7563.
- [245] H. Kessler, M. Bernd, I. Damm, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4685–4688.

- [246] H. Morita, Y. Sook Yun, K. Takeya, H. Itokawa, M. Shiro, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5987–6002.
- [247] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18336–18341.
- [248] P. Tremmel, A. Geyer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5913–5915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5789–5791.
- [249] H. Morita, Y. S. Yun, K. Takeya, H. Itokawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9593–9596.
- [250] P. Sonnet, L. Petit, D. Marty, J. Guillon, J. Rochette, J.-D. Brion, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1681–1683.
- [251] M. Lamping, S. Enck, A. Geyer, *European J. Org. Chem.* **2015**, 7443–7448.
- [252] M. Tirado, N. C. Polfer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6542–6544; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6436–6438.
- [253] U. Schmidt, J. Langner, *J. Pept. Res.* **2009**, *49*, 67–73.
- [254] I. Z. Siemion, T. Wieland, K.-H. Pook, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 712–714; *Angew. Chemie Int. Ed.* **1975**, *14*, 702–703.
- [255] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chemie Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
- [256] M. Lamping, S. Enck, A. Geyer, *European J. Org. Chem.* **2015**, 7399–7405.
- [257] B. E. Maki, K. A. Scheidt, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1651–1654.
- [258] S. V. Ley, J. Norman, W. P. Griffith, S. P. Marsden, *Synthesis* **1994**, *7*, 639–666.
- [259] L. Yang, Oxidation von Iminen zu Amiden, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [260] V. Popov, S. S. Panda, A. R. Katritzky, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1594–1597.
- [261] B. O. Lindgren, T. Nilsson, S. Husebye, Ø. Mikalsen, K. Leander, C.-G. Swahn, *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 888–890.
- [262] B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091–2096.
- [263] L. R. Ruhaak, E. Steenvoorden, C. a M. Koeleman, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Proteomics* **2010**, *10*, 2330–2336.
- [264] M. D. Bomann, I. C. Guch, M. DiMare, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5995–5996.
- [265] Q. Lei, Y. Wei, D. Talwar, C. Wang, D. Xue, J. Xiao, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4021–4029.
- [266] G. B. Giovenzana, D. Imperio, A. Penoni, G. Palmisano, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1095–1099.
- [267] S. Sato, T. Sakamoto, E. Miyazawa, Y. Kikugawa, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7899–7906.
- [268] A. Pelter, R. M. Rosser, S. Mills, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 717–720.
- [269] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897–2904.
- [270] A. F. Abdel-Magid, S. J. Mehrman, *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 971–1031.
- [271] J. Plag, Studien zu peptidischen Kleeblattknoten, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [272] M. Malesevic, U. Strijowski, D. Bächle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73–77.
- [273] T. Cierpicki, J. Otlewski, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 249–261.
- [274] A. Pardi, G. Wagner, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *137*, 445–454.

- [275] B. Heinrich, Synthese cyclischer Enaminpeptide und die Untersuchung des cis/trans-Verhältnisses in Prolin-Tripeptiden, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [276] J. Peng, H. Gao, X. Zhang, S. Wang, C. Wu, Q. Gu, P. Guo, T. Zhu, D. Li, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2218–2223.
- [277] S. S. Ebada, T. Fischer, A. Hamacher, F.-Y. Du, Y. O. Roth, M. U. Kassack, B.-G. Wang, E. H. Roth, *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 776–781.
- [278] Y. Kumar, L. Florvall, *Synth. Commun.* **1983**, *13*, 489–493.
- [279] S. T. Heller, E. E. Schultz, R. Sarpong, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8429–8433; *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 8304–8308.
- [280] F. He, B. M. Foxman, B. B. Snider, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6417–6418.
- [281] G. W. Gribble, J. H. Hoffman, *Synthesis* **1977**, *1977*, 859–860.
- [282] C.-H. Yao, J.-S. Song, C.-T. Chen, T.-K. Yeh, M.-S. Hung, C.-C. Chang, Y.-W. Liu, M.-C. Yuan, C.-J. Hsieh, C.-Y. Huang, et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 166–178.
- [283] N. Tajima, S. Nakatsuka, *Heterocycl. Commun.* **2000**, *6*, 59–62.
- [284] M. Somei, N. Oshikiri, M. Hasegawa, F. Yamada, *Heterocycles* **1999**, *51*, 1237–1242.
- [285] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [286] N. Carulla, C. Woodward, G. Barany, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 726–741.
- [287] C. Buré, P. Marceau, H. Meudal, A. F. Delmas, *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 147–154.
- [288] K. D. Roberts, J. N. Lambert, N. J. Ede, A. M. Bray, *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 659–665.
- [289] A. O. Ogunkoya, V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9831–9835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9693–9697.
- [290] C. E. Murar, F. Thuaud, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 18140–18148.
- [291] T. Fukuzumi, L. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5837–5844.
- [292] L. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2259–2264.
- [293] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1270–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252.
- [294] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 528–531; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 513–516.
- [295] Y. Grell, Oxim-vermittelte Makrozyklisierung von Peptiden, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [296] M. Lamping, Y. Grell, A. Geyer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 228–235.
- [297] J. D. Hepworth, *Org. Synth.* **1965**, *45*, 1–4.
- [298] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553.
- [299] C. L. Perrin, T. J. Dwyer, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935–967.
- [300] J. Kördel, S. Forsén, T. Drakenberg, W. J. Chazin, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4400–4409.

- [301] U. Reimer, N. El Mokdad, M. Schutkowski, G. Fischer, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13802–13808.
- [302] M. Shibukawa, A. Miyake, S. Eda, S. Saito, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9280–9287.
- [303] R. Criegee, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1931**, *64*, 260–266.
- [304] L. Malaprade, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1928**, *4*, 683–696.
- [305] K. Rose, J. Chen, M. Dragovic, W. Zeng, D. Jeannerat, P. Kamalaprija, U. Burger, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 1038–1043.
- [306] D. Qasmi, E. de Rosny, L. René, B. Badet, I. Vergely, N. Boggetto, M. Reboud-Ravaux, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 707–714.
- [307] O. El-Mahdi, O. Melnyk, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 735–765.
- [308] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4319–4328.
- [309] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *Biochemistry* **1962**, *1*, 773–778.
- [310] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7743–7746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581–7584.
- [311] R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6236–6248.
- [312] T. Dierks, A. Dickmanns, A. Preusser-Kunze, B. Schmidt, M. Mariappan, K. von Figura, R. Ficner, M. G. Rudolph, *Cell* **2005**, *121*, 541–552.
- [313] T. Dierks, B. Schmidt, L. V Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, *113*, 435–444.
- [314] M. Sunbul, J. Yin, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3361–3371.
- [315] M. Knop, P. Engi, R. Lemnaru, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2147–2150.
- [316] J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2303–2306.
- [317] J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 537–551.
- [318] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (USA), **2006**.
- [319] G. Bold, H. Steiner, L. Moesch, B. Walliser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 405–410.
- [320] G. Kokotos, J. M. Padrón, T. Martín, W. A. Gibbons, V. S. Martín, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3741–3744.
- [321] C. Harries, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1905**, *343*, 311–344.
- [322] R. Criegee, *Angew. Chemie* **1975**, *87*, 765–771.
- [323] O. Melnyk, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, H. Gras-Masse, *Biopolymers* **2000**, *55*, 165–186.
- [324] V. VanRheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973–1976.
- [325] R. Pappo, D. S. Allen, Jr., R. U. Lemieux, W. S. Johnson, *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 478–479.
- [326] A. Blond, J. Péduzzi, C. Goulard, M. J. Chiuchiolo, M. Barthélémy, Y. Prigent, R. A. Salomón, R. N. Farías, F. Moreno, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *259*, 747–756.
- [327] A. M. Roeder, Y. Roettger, A. Stündel, R. Dodel, A. Geyer, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27638–27645.



- [328] B. L. Kier, J. M. Anderson, N. H. Andersen, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5363–5371.
- [329] C. Wu, J.-C. Leroux, M. A. Gauthier, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 1044–1049.
- [330] R. Kishore, P. Balaram, *Biopolymers* **1985**, *24*, 2041–2043.
- [331] A. K. Kancharla, S. Meesala, P. Jorwal, R. Palanisamy, S. K. Sikdar, S. P. Sarma, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1847–1860.
- [332] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901–926.
- [333] D. Sharma, K. Rajarathnam, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 165–171.
- [334] O. A. Martin, M. E. Villegas, J. A. Vila, H. A. Scheraga, *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 217–225.
- [335] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311–333.
- [336] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67–81.
- [337] H. T. He, R. N. Gürsoy, L. Kupczyk-Subotkowska, J. Tian, T. Williams, T. J. Siahaan, *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2222–2234.
- [338] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657–6662.
- [339] K. Ramalingam, G. H. Snyder, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11155–11161.
- [340] Z. Wu, B. Ericksen, K. Tucker, J. Lubkowski, W. Lu, *J. Pept. Res.* **2004**, *64*, 118–125.
- [341] L. Zervas, D. M. Theodoropoulos, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1359–1363.
- [342] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [343] I. Ramos-Tomillero, L. Mendive-Tapia, M. Góngora-Benítez, E. Nicolás, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Molecules* **2013**, *18*, 5155–5162.
- [344] D. Veber, J. Milkowski, S. Varga, R. Denkwalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5456–5461.
- [345] J. Eichler, R. Houghten, *Protein Pept. Lett.* **1997**, *4*, 157–164.
- [346] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 899–915.
- [347] D. Andreu, F. Albericio, N. A. Solé, M. C. Munson, M. Ferrer, G. Barany, *Peptide Synthesis Protocols*, Humana Press, New Jersey, **1994**, pp. 91–170.
- [348] L. Chen, I. Annis, G. Barany, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (USA), **2001**, pp. 1–19.
- [349] I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, *Methods in Enzymology* **1997**, *289*, 198–221.
- [350] L. Moroder, D. Besse, H. J. Musiol, S. Rudolph-Böhner, F. Siedler, *Biopolymers* **1996**, *40*, 207–234.
- [351] E. E. Büllsbach, C. Schwabe, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10754–10761.
- [352] S. E. Escher, H. Sticht, W. G. Forssmann, P. Rösch, K. Adermann, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 505–513.
- [353] M. A. Andrade, P. Chacón, J. J. Merelo, F. Morán, *Protein Eng.* **1993**, *6*, 383–390.
- [354] B. A. Wallace, *J. Synchrotron Radiat.* **2000**, *7*, 289–295.

- [355] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2876–2890.
- [356] K. Gimpl, M. Textor, S. Keller, *Anal. News* **2013**, 1–4.
- [357] S. Brahms, J. Brahms, *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 149–178.
- [358] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, *1751*, 119–139.
- [359] S. Kelly, N. Price, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1*, 349–384.
- [360] M. Iwatsuki, H. Tomoda, R. Uchida, H. Gouda, S. Hirono, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7486–7491.
- [361] M. F. Pomares, R. A. Salomón, O. Pavlova, K. Severinov, R. Farías, P. A. Vincent, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5734–5738.
- [362] M. Schlamowitz, L. U. Peterson, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 3137–3145.
- [363] A. J. Cornish-Bowden, J. R. Knowles, *Biochem. J.* **1969**, *113*, 353–362.
- [364] K. J. Bryant, L. C. Read, G. Forsberg, J. C. Wallace, *Growth Factors* **1996**, *13*, 261–272.
- [365] G. Bertani, *J. Bacteriol.* **1951**, *62*, 293–300.
- [366] S. G. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, D. Hanahan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4645–4649.
- [367] R. G. Taylor, D. C. Walker, R. R. McInnes, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1677–1678.
- [368] Y. Nguyen, V. Sperandio, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 1–7.
- [369] M. A. Chattaway, T. Dallman, I. N. Okeke, J. Wain, *J. Infect. Dev. Ctries.* **2011**, *5*, 425–436.
- [370] K. Sandvig, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5943–5950.
- [371] K. Sandvig, J. Bergan, A.-B. Dyve, T. Skotland, M. L. Torgersen, *Toxicon* **2010**, *56*, 1181–1185.
- [372] C. Farrokh, K. Jordan, F. Auvray, K. Glass, H. Oppegaard, S. Raynaud, D. Thevenot, R. Condrón, K. De Reu, A. Govaris, et al., *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 190–212.
- [373] S. M. Fadlallah, E. A. Rahal, A. Sabra, K. A. B. Kissoyan, G. M. Matar, *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 47–55.
- [374] T. J. Ochoa, J. Chen, C. M. Walker, E. Gonzales, T. G. Cleary, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2837–2841.
- [375] A.-L. Lapeyraque, M. Malina, V. Fremeaux-Bacchi, T. Boppel, M. Kirschfink, M. Oualha, F. Proulx, M.-J. Clermont, F. Le Deist, P. Niaudet, et al., *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2561–2563.
- [376] L. Pape, H. Hartmann, F. C. Bange, S. Suerbaum, E. Bueltmann, T. Ahlenstiel-Grunow, *Medicine* **2015**, *94*, 1–6.
- [377] A. G. Cochran, R. T. Tong, M. A. Starovasnik, E. J. Park, R. S. McDowell, J. E. Theaker, N. J. Skelton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 625–632.
- [378] T. Nakamura, H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, Y. Shimonishi, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16709–16713.
- [379] S. Fischer, A. Geyer, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3928–3933; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3849–3853.

- [380] E. Gavrish, C. S. Sit, S. Cao, O. Kandror, A. Spoering, A. Peoples, L. Ling, A. Fetterman, D. Hughes, A. Bissell, et al., *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 509–518.
- [381] Q. Wang, Y. Wang, M. Kurosu, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3372–3375.
- [382] L. Kollipara, R. P. Zahedi, *Proteomics* **2013**, *13*, 941–944.
- [383] D. B. G. Williams, M. Lawton, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351–8354.
- [384] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, **1997**, pp. 19–228.
- [385] J. G. Adamson, M. A. Blaskovich, H. Groenevelt, G. A. Lajoie, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3447–3449.

## 8 Anhang

### Danksagung

Abschließend möchte Ich allen, die etwas zu dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

*Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel* danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens, der Versorgung mit nativem Microcin J25 sowie der Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

*Prof. Dr. Robert Berger* danke ich für die Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Bei *Dr. Xiulan Xie, Dr. Roland Wagner, Gert Häde* und *Cornelia Mischke* möchte ich mich für die Aufnahme diverser NMR-Hochfeldmessungen und für das ein oder andere informative Gespräch bezüglich des 600 MHz-Spektrometers bedanken. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der eigenständigen Messung am 600 MHz-Spektrometer bedanken.

Den Mitarbeitern der massenspektroskopischen Abteilung, *Dr. Uwe Linne, Jan Bamberger, Natalie Fritzler, Martina Gerlach, Tina Krieg, Heike Mallinger, Yvonne Ulrich* und *Anna-Lena Hemer* danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und das Testen der synthetischen Peptide auf ihre biologische Aktivität gegen diverse Bakterienstämme möchte ich mich bei *Dr. Mobarak Abu Mraheil* der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Bei der *Evonik-Stiftung* möchte ich mich für die finanzielle und vor allem für die ideelle Unterstützung bedanken. Besonders hervorheben möchte ich *Susanne Peitzmann, Dr. Weckbecker* und *Prof. Leuchtenberger*, die mir während dieser Arbeit immer hilfreich zur Seite standen.

*Susanne Schellenberg* möchte ich für jegliche organisatorische Arbeiten, das gemeinsame Einreichen von Manuskripten, das Annehmen der Pizza-Lieferung von Giovanni's Pizzataxi Bella Pistazie und vielem mehr danken. Wenigstens eine hält den Laden zusammen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK *Geyers* sowie des AK *Oberthürs* möchte ich für die gute Zeit auf den Lahnbergen danken.

*Jonas Hühn* möchte ich für die unglaubliche Zeit seit 2008 danken! Besonders während deiner Masterarbeit hatte ich die beste Zeit im Labor und musste oft daran zurückdenken. Ohne dich wäre vieles nicht so gut geworden (KWT 2014, Laufen bei 40 °C im Schatten und und und...). Danke für alles und lass die Tage mal wieder in die Oberstadt.

Dem mittlerweile Züricher *Carl-Philipp Rosenau* danke ich vor allem für die gute Zeit während des Studiums. De Dorscht, der macht erscht richtig Spaß, hoscht so e Pälzer Dubbeglas.

*Felix Weiher* danke ich dafür, dass er mich überhaupt für die Peptidchemie begeistert hat, ohne dich wäre ich wahrscheinlich nicht da, wo ich jetzt bin. Auch später, während meiner Arbeit, habe ich deine Ratschläge immer gerne angenommen. Außerdem Danke dafür, dass du dich immer für ein Feierabendbierchen, lustige Abende bei euch in der WG oder nur zum Laufen zur Verfügung gestellt hast!

Bei *Sabrina Fischer* möchte ich mich für die gemeinsam besuchten Tagungen, die guten Zeiten in München, Jena und Istanbul bedanken. Besonders die Zeit in Jena werde ich immer in guter Erinnerung halten. Auch für die eine oder andere Hilfestellung bezüglich der Disulfide war ich sehr froh.

Den beiden Exil-Kasslern *Andreas Roeder* und *Susanne Kümmel* danke ich für die schönen Abende in Kassel, besonders die mit Brain O’Gott & Co. Your Home is your Kassel! Ich freue mich schon auf den 2. Juli! Auch die Tage im KWT werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

Bei *Christoph Klotz* möchte ich mich für die Gespräche über Fussball bedanken, bei denen ich immer gemerkt habe, dass ich keine Ahnung habe. Das Global Geiss Labor auf A6 werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

*Maryna Abacılar* möchte ich für die vielen Gespräche über den Sinn und Unsinn der labortechnischen Arbeit am Wochenende danken und dafür, dass du mir gezeigt hast, wie

man auch ohne die geringste Motivation motiviert bleibt. Der ständige Putzfimmel war zwar gut für unseren Kaffeeraum, aber nicht gut für deine Gesundheit.

*Romina Kirschner* danke ich für die unfassbare Kuchenversorgung. Was wir da essen durften wird so schnell nicht getoppt (vor allem dieses Himbeer-Sahne-Leibniz-Ding). Außerdem danke ich dir für die stets gute Laune und immerhin haben wir es mal geschafft zusammen zu laufen. Achja, viel Erfolg mit den Boronsäuren.

Bei *André Wuttke* möchte ich mich für die unzähligen Gespräche über unwissenschaftliches Arbeiten bedanken, besonders über das SnippingTool und PowerPoint. Ich denke, die haben uns beiden öfters mal gut getan. Außerdem Danke für die stete Kaffeeverversorgung, ohne die wäre ich jetzt noch nicht fertig.

Für die gute Zeit während des JCFs in Münster und als nächster Laborkollege im Neubau möchte ich mich bei *Andreas Schrimpf* bedanken. Außerdem Danke für deinen blühenden Sarkasmus sowie die hilfreichen Ratschläge bei der englischen Sprache. Gracias.

Der Wassermann is da! *Stefan Lenz* möchte ich für die Getränke-Versorgung danken sowie den gemeinsamen Aufbau des Synthis. Immerhin hattest du auch 'nen derben Schädel durch Giorgios DMF. Und lass immer mal wieder KIZ im Labor laufen, wenn ich weg bin.

*Lennart „der Bub“ Nicke* danke ich für den äußerst guten musikalischen Geschmack im Labor und die Weisheit „*One Column a day, keeps the doctor away*“. Ich hoffe, du nimmst das nicht zu ernst und promovierst auch noch. Der Boy und Maryna wären stolz auf dich.

Auch wenn er letztes Jahr unseren Arbeitskreis verlassen hat und nun in Linden arbeitet, möchte ich *Steffen Müller* besonders für die gute Zeit nach 18 Uhr danken. Es war mir immer eine Ehre.

*Johannes Reim* wünsche ich für die kommende Zeit und seine restliche Ausbildung in unseren Wänden alles Gute, aber ich denke, Frau Conrad hat dich gut auf alles weitere vorbereitet.

*Christoph Priem* danke ich für die Unterstützung der studentischen Esskultur, auch wenn er sich mittlerweile Brötchen holt und wünsche ihm alles Gute für die weitere Promotion.

Für die vielen fachlichen Gespräche, ständige Unterstützung zum täglichen Mensagang, Diskussionen, welche Games die besten sind und vieles mehr möchte ich meinem alten Labornachbar auf A6 *Sebastian Fischer* danken. Und eine Playstation ist besser als eine Xbox.

Dem Herren des Bällebads *Maximilian Jung* danke ich für seine offene, hilfsbereite und vor allem lustige Art. Auf dass du eine gute Zeit hast, die Peptide sich von selbst synthetisieren und du dich nicht an Kleinigkeiten aufhältst. Achja, ein Bett im Archiv ist immer für dich frei.

*Jan Reutzel* danke ich für die eine oder andere Idee in chemischen Dingen, die Versorgung mit einem funktionierenden Server und der steten Bereitschaft seinen SkyGo Account zur Verfügung zu stellen.

*Ulrich Meyberg* danke ich für seine unglaublich positive Art Dinge anzugehen und nicht so schnell aufzugeben. Ich wünsche dir für deine Zukunft nur das Beste!

Sämtlichen Bachelor-Studenten (*Benedikt Heinrich, Lu Yang, Johanna Plag, Sidika Yilmaz* und *Yvonne Grell*) sowie Vertiefer-Studenten (*Oliver Born, Philipp Hofmann, Patrick Baumann* und *Matthias Tripp*) möchte ich für ihre aufgebrachte Motivation und die schöne Zeit danken.

Seit meinem 22-igsten Geburtstag in 2010 warst du immer an meiner Seite und hast mich immer unterstützt. Du hast mich aber auch oft auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt und dafür danke ich dir besonders, *Laura*. Die Zeit mit dir ist etwas sehr Schönes und ich bin unglaublich froh, dass ich dich habe! Ich liebe dich.

Wo soll ich anfangen...meinem Bruder *Frank* danke ich für einfach alles! Du hast indirekt mit den größten Anteil an dieser Arbeit beigetragen und die Zeit mit dir ist immer der Wahnsinn. Darauf, dass wir irgendwann mal wieder in Malaga auf der Dachterasse liegen, einen Apfel in der Hand halten und es uns so gut geht wie nie! Danke!

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern *Gitta* und *Hans-Joachim* danken, die all dies überhaupt erst ermöglicht haben. Die gute Kindheit in Dillenburg, die finanzielle Unterstützung während des Studiums und die schöne Zeit in Bremen haben sich gelohnt. Vielen lieben Dank euch beiden!





## **Erklärung**

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation:

„Reversible Cyclisierung von Peptiden – neue Synthesewege für Peptidantibiotika“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 04.04.2016

Matthias Lamping